

Kvantifisering av P-glykoprotein ved bruk av LC-MS/MS

Marte Kristine Myhrer



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2015

Kvantifisering av P-glykoprotein ved bruk av LC-MS/MS

Masteroppgaven ble utført ved faggruppen for farmakokinetikk

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITET I OSLO



Veiledere:

Professor Monica Hermann, Farmasøytisk Institutt, Universitet i Oslo

Professor Hege Christensen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

© Marte Kristine Myhrer

År 2015

Tittel: Kvantifisering av P-glykoprotein ved bruk av LC-MS/MS

Forfatter: Marte Kristine Myhrer

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, under veiledning av professor Monica Hermann. Arbeidet ble påbegynt i august 2014 og avsluttet i mai 2015.

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min dyktige hovedveileder Monica Hermann for uvurderlig hjelp og veiledning dette året. Takk for god opplæring på lab og hjelpsomme tips i skriveprosessen. Videre vil jeg få takke professor Hege Christensen for faglige bidrag, gode tilbakemeldinger og støtte, spesielt under skriveprosessen. Dere har hatt gitt meg gode innspill og oppmuntrende ord gjennom hele året.

En spesiell takk rettes til overingeniør Siri Johannesen for gode råd og hjelp, med alt fra arbeid på lab til blodprøvetaking. Takk til professor Léon Reubsaet ved avdeling for farmasøytisk kjemi for gode innspill underveis, og til postdoktor Ida Robersten for hjelp på lab og god støtte. Takk til resten av farmakokinetikkgruppa for hyggelige og inspirerende tirsdagsmøter, og til ansatte på Gyda for et trivelig arbeidsmiljø.

Jeg må også få takke de andre medstudentene på kullet for fem fine år, og spesiell takk til ”gjengen” – de siste fem årene hadde ikke vært det samme uten dere! Sist, men ikke minst, tusen takk til Martine Strøm for utrolig god hjelp med figurer til oppgaven, venner og familie for at dere har tatt ekstra godt vare på meg det siste året og en stor takk til Fredrik for all støtte og omtanke.

Oslo, 13. mai 2015

Marte Kristine Myhrer

Sammendrag

Bakgrunn: ABC-transportøren P-glykoprotein (P-gp) er et ATP-avhengig transportprotein lokalisert i en rekke vev, blant annet lymfocytter. Det er vist at P-gp er oppregulert i lymfocytter ved enkelte sykdomstilstander, som for eksempel inflammatoriske sykdommer. En slik oppregulering kan gi behandlingsresistens for pasienter behandlet med immunsuppressiva, som har sitt virkested intracellulært i lymfocytter. En kvantifisering av P-gp vil være et skritt på veien i forståelsen av transportørens betydning for legemiddelresistens. Hensikten med denne oppgaven var derfor å utvikle en LC-MS/MS metode for kvantifisering av P-gp i lymfocytter.

Metode: Perifere mononukleære celler ble isolert fra fullblod til friske frivillige. Som standard ble det benyttet isolerte cellemembraner fra insektceller transfektert med humant *ABCB1* (P-gp). Homogenisering av standard og celler ble gjort ved bruk av en «bead-beater», Precellys®24, med 0,5 mm glasskuler i 0,5 ml rør og 1,4 mm og 2,8 mm keramiske kuler i henholdsvis 0,5 ml og 2 ml rør. Ulike tider og hastigheter for homogenisering ble studert (3x30 sekunder, 4x30 sekunder og 4x20 sekunder ved 5000 rpm, og 3x15 sekunder ved 5500 rpm). Til metodeutvikling ble prøver uten proteaseinhibitor og prøver med proteaseinhibitor tilsatt på ulike tidspunkt i prosedyren undersøkt. Opprensing av prøven ble utført ved bruk av indirekte immunoekstraksjon med magnetiske kuler dekket med protein G (Dynabeads®). Deretter ble proteolyse av P-gp utført ved bruk av trypsin (10 mM dithiothreitol og 50 mM jodeddiksyre). Prøvene ble rensset opp ved fast-fase ekstraksjon før signaturpeptidet ble målt ved hjelp av LC-MS/MS.

Resultater: Av kuletypene som ble forsøkt ga kun 0,5 mm glasskuler i 0,5 ml rør signaler for P-gp, med et utbytte på ca. 50%. Forsøk med ulike betingelser for homogenisering viste at 3x30 sekunder ved 5000 rpm ga godt utbytte av P-gp standard og lite variasjon i utbytte. Ved tilsetning av proteaseinhibitor til prøver før og etter homogenisering ble det ikke målt detekterbare mengder P-gp. I forsøk der proteaseinhibitor ble tilsatt før immunoekstraksjon uten forutgående homogenisering ble det derimot målt signaler for P-gp, med et utbytte på ca. 35%, tilsvarende prøver som ikke ble tilsatt proteaseinhibitor. Det tyder på at proteaseinhibitor ikke forstyrrer immunoekstraksjon og proteolyse. Forsøk der celler ble blandet med P-gp standard ga ikke detekterbare mengder P-gp.

Konklusjon: Det er blitt utviklet en metode for å måle P-gp i transfekterte cellemembraner. Metoden må optimaliseres ytterligere for å kvantitativt måle P-gp i lymfocytter isolert fra fullblod fra pasienter.

Abstract

Background: The ABC-transporter P-glycoprotein is an ATP-dependent transport protein that is localized in most of tissues throughout the body, including lymphocytes. Studies have shown that P-gp is upregulated within certain diseases, such as inflammatory diseases. This upregulation can give rise to resistance against drug treatment for patients treated with immunosuppressants, who has their target site located inside the lymphocytes. A method for quantification of P-gp would be a key factor for understanding the role of this transporter in drug resistance. The aim of this project was to develop a LC-MS/MS method for quantification of P-gp in lymphocytes.

Method: Peripheral mononuclear cells were isolated from blood from healthy volunteers. As a standard, isolated cell membranes from insects transfected with human *ABCB1* (P-gp). The cells and P-gp standard were homogenized by using a “bead beater”, Precellys®24, with 0,5 mm glass beads in 0,5 ml tubes, and 1,4 mm and 2,8 mm ceramic beads in 0,5 ml and 2 ml tubes, respectively. Different times and speed for homogenization were tested (3x30 seconds, 4x30 seconds and 4x20 seconds at 5000 rpm, and 3x15 seconds at 5500 rpm). For method development, samples without protease inhibitor and samples with protease inhibitor added at different points under the procedure were examined. Sample clean up was performed by using indirect immunoprecipitation with magnetic beads covered with protein G (Dynabeads®). Then proteolysis of P-gp was conducted by using trypsin (10 mM dithiothreitol and 50 mM iodoacetic acid). Solid phase extraction was used for sample clean up and before the signature peptide was analyzed by LC-MS/MS.

Results: Only 0,5 mm glass beads in 0,5 ml tubes gave signals for P-gp, with a yield of approximately 50%. Trials with different times and speed for homogenization were investigated showed that 3x30 seconds with 5000 rpm gave a good yield of P-gp and also little variation. When adding protease inhibitor to the samples before and after homogenization, no detectable amounts of P-gp were measured. In trials where protease inhibitor was added before immunoprecipitation without prior homogenization, signals for P-gp were measured, with a yield of approximately 35%, equivalent to samples without protease inhibitor. This suggests that protease inhibitors do not interfere with the

immunoprecipitation or proteolysis. PBMC mixed with P-gp standard gave no detectable amounts of P-gp.

Conclusion: There has been developed a method to measure P-gp in transfected cell membranes. The method must be further optimized to quantitatively measure P-gp in lymphocytes from blood.

Forkortelser

ABC	Ammoniumbikarbonat
ABC-transportør	ATP-bindende kasett-transportør
ACN	Acetonitril
ADME	Absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminiasjon
ADP	Adenosindifosfat
ATP	Adenosintrifosfat
CYP-450	Cytokrom P-450
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektronspray ionisering
HPLC	High performance liquid chromatography (væskeskromatografi)
IAA	Iodoacetic acid (Jodeddiksyre)
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
MDR1	Multidrug resistance protein 1
mQ-vann	Milli-Q vann
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Massespektrometer
NBD	Nukleotidbindende domene
PBMC	Perifere mononukleære celler
PBS	Fosfatbufret saltvann
P-gp	P-glykoprotein
Rpm	Runder pr. minutt
SLE	Systemisk lupus erythematosus
SIL-peptid	Stabil-isotop labeled peptid
SIM	Selected-ion-monitoring
SLC	Solute-carrier
TMD	Transmembrant domene
YB-1	Y-boksbindende protein-1

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
1.1	Variabilitet i legemiddelrespons	1
1.1.1	Farmakodynamisk variabilitet	1
1.1.2	Farmakokinetisk variabilitet	1
1.2	Transportører	3
1.2.1	P-glykoprotein	4
1.3	Individuell variabilitet i P-gp	6
1.4	Kvantifisering av P-glykoprotein	8
1.5	Utfordringer knyttet til membranbundne proteiner	9
1.6	Prøveopparbeidelse	9
1.7	Apparatur for analyse: HPLC-MS/MS	13
1.8	Hensikt med oppgaven	14
2	Materialer og metode	15
2.1	Materialer	15
2.1.1	Kjemikalier	15
2.1.2	Utstyr	15
2.1.3	Løsninger	17
2.2	Metode	20
2.3	Isolering av perifere mononukleære celler fra fullblod	20
2.4	Repeterbarhet av uttak av standard	21
2.5	Indirekte immunoekstraksjon	22
2.6	Proteolyse	23
2.7	Fast-fase ekstraksjon	24
2.8	Analyse ved LC-MS/MS	25
2.9	Optimalisering av metode	26
2.9.1	Homogenisering av PBMC og membranfragmenter	26
2.9.2	Ekstraksjon med magnetiske kuler etter homogenisering	28
2.9.3	Ulike konsentrasjoner proteaseinhibitor	29
2.9.4	Tilsetting av proteaseinhibitor uten EDTA	29
2.9.5	Tilsats av proteaseinhibitor på ulike steder i prosedyren	29
2.9.6	Tilsats av antistoff før og etter homogenisering	31

2.9.7	Tilsats av P-gp standard til ulike trinn.....	32
3	Resultater	34
3.1	Analysevariasjon	34
3.2	Repeterbarhet av uttak.....	35
3.3	Ulik type kuler i Precellysrør	35
3.4	Ulike betingelser for homogenisering.....	35
3.5	Ekstraksjon med magnetiske kuler etter homogenisering	36
3.6	Tilsetning av proteaseinhibitor	36
3.7	Antistoffer tilsatt før og etter homogenisering	37
3.8	Standard tilsatt før og etter immunoekstraksjon	37
3.9	Beregning av utbytte	38
4	Diskusjon	39
5	Konklusjon.....	44
	Litteraturliste	45

1 Innledning

1.1 Variabilitet i legemiddelrespons

Forskjell i legemiddelrespons mellom individer er et vanlig og kjent problem [1]. En dose av et legemiddel som er trygt og effektivt hos en pasient kan gi bivirkninger og toksiske reaksjoner hos en annen pasient ved inntak av samme dose. Forskjellen i legemiddelrespons kan forekomme av en rekke årsaker. Genetisk variasjon, miljøfaktorer og patofysiologiske forhold er noen av grunnene til variasjonen [2]. Variasjon kan oppstå i gener som koder for legemiddelmetaboliserende enzymer, legemiddeltransportører eller ulike målproteiner der legemiddelet utøver sin effekt (for eksempel reseptorer). Det er anslått at mellom 20-95% av variasjon i legemiddelrespons og effekt kan skyldes genetikk [3]. Andre årsaker til ulik behandlingsrespons er pasientens alder, høyde, vekt og samtidig inntak av andre legemidler [4]. Sammen vil disse faktorene kunne påvirke plasmakonsentrasjonen til legemiddelet, og dermed også påvirke legemiddelets effekt på virkestedet (eks. enzymer, reseptorer). For lav eksponering av legemiddelet vil kunne føre til ufullstendig effekt av legemiddelet, mens for mye eksponering kan gi uønskete effekter i form av bivirkninger [1]. Videre kan også pasientens innstilling til behandling bidra til variasjon i respons. En tro på at behandling skal virke kan påvirke behandlingen i en positiv forstand (placebo), mens en forventning om at behandlingen vil virke negativt kan føre til dårlig behandlingsrespons (nocebo) [5].

1.1.1 Farmakodynamisk variabilitet

Farmakodynamikk beskriver effekten av et legemiddel på kroppen. Genetisk variasjon i ”drug targets” som legemiddelreseptorer og enzymer er de viktigste årsakene til farmakodynamisk variabilitet. Samtidig inntak av andre legemidler kan føre til farmakodynamiske interaksjoner. Ved å bruke en antagonist og agonist som virker på samme reseptor kan en slik interaksjon oppstå. Dette kan føre til toksiske bivirkninger, eller det kan forhindre virkningen av legemiddelet [6, 7].

1.1.2 Farmakokinetisk variabilitet

Farmakokinetikk beskriver forholdet mellom dose av et legemiddel og konsentrasjon i kroppen over tid. Absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon (ADME) utgjør de sentrale prosessene i farmakokinetikk. Farmakokinetisk variasjon mellom individer kan forekomme av mange ulike årsaker, som ulik kroppsbygging og fettfordeling, sykdom i

legemiddelmetaboliserende organer, genetisk variasjon, grad av binding av legemidler til plasmaproteiner, nedsatt absorpsjon i mage-tarmkanalen og legemiddelinteraksjoner [6].

Oralt inntak av legemidler er den vanligste og mest praktiske administrasjonsformen. Absorpsjonen av legemidler styres av legemiddelets fysikalsk-kjemiske egenskaper, blodflow og overflateareal til stedet der legemiddelet absorberes. På grunn av at arealet i tarmen er mye større enn arealet i magesekken absorberes det mer legemiddel i tarm enn i magesekken. Transittid i magesekken og tarmkanalen vil også være en faktor av betydning for absorpsjonshastigheten av legemiddelet [8].

Metabolisme av lipofile legemidler til mer hydrofile metabolitter er viktig for eliminasjon av legemidlene. Enkelte legemidler må også undergå metabolisme for å danne en aktiv form av legemiddelet. Metabolisme av legemidler deles inn i fase I og fase II metabolisme. Fase I metabolisme innebærer prosesser som hydrolyse, oksidasjon og reduksjon, mens fase II metabolisme innebærer konjugering av modersubstans eller fase I metabolitt til hydrofile stoffer som skilles ut via urin og feces. Enzymene som er ansvarlig for fase I og II metabolisme er hovedsakelig lokalisert i lever [1, 8]. Spesielt viktig er enzymene i cytokrom P-450 enzymfamilien (CYP-enzymmer). Polymorfisme i genene som koder for disse enzymene kan gi opphav til variasjon i metabolisme av ulike legemidler [9]. Inntak av andre legemidler, mat og næringsmidler og miljøfaktorer som røyk kan også påvirke enzymenes metaboliserende egenskaper og kan være en kilde til individuell variasjon.

De to viktigste organene for eliminasjon av legemidler fra kroppen er lever og nyrer [10]. Faktorer som binding til plasmaproteiner og utskillelse via galle er parametere som kan ha betydning for legemidlers kinetikk, og disse faktorene påvirkes av leverfunksjonen. Sykdom i lever kan blant annet føre til redusert metabolisme og eliminasjon av legemidler. Dette kan gi akkumulering av legemidler og metabolitter, som kan resultere i økt risiko for bivirkninger og toksiske reaksjoner [11]. Eliminasjon gjennom nyrene skjer ved glomerulær filtrasjon, aktiv sekresjon og passiv reabsorpsjon [8]. Endret nyrefunksjon, som for eksempel på grunn av sykdom, kan føre til nedsatt eliminasjon av legemidler, og det kan også gi en opphopning av metabolitter som ikke blir tilstrekkelig skilt ut via nyrene [10].

I de fleste tilfeller må legemidler krysse biologiske membraner for å nå sitt virkested. De fleste legemidler passerer cellemembraner ved passiv diffusjon, der legemiddelmolekylet

diffunderer med en konsentrasjonsgradient [8]. I tillegg til passiv diffusjon kan legemidler krysse membranen ved hjelp av aktiv transport. Transportører sitter i cellemembranen og styrer innfluks og effluks av ulike substanser [12]. På samme måte som for CYP-enzymene kan genetisk polymorfisme gi opphav til ulik aktivitet og ekspresjon av transportører mellom individer. Genetiske variasjoner i transportører har imidlertid vist seg å ikke ha like stor effekt på farmakokinetikk (med noen få unntak) sammenlignet med hva tilfellet er for CYP-enzymene [13].

1.2 Transportører

Transportører er store membranbundne proteiner som uttrykkes i vev i hele kroppen [14]. Opptak av viktige stoffer som sukker, aminosyrer, nukleotider og legemidler, og effluks av avfallsprodukter og andre xenobiotika styres av disse transportørene [15, 16]. Slik opprettholdes det et normalt nivå av endogene substanser i kroppen [16]. Transportører kan deles inn i passive og aktive transportører på bakgrunn av virkningsmekanismen. Ved passiv transport diffunderer ulike stoffer over membranen med konsentrasjonsgradienten. Aktiv transport innebærer bruk av energi, for eksempel ATP-hydrolyse [15]. Den aktive transporten kan være primær eller sekundær. Ved primær transport blir transporten av molekylet drevet frem av ATP hydrolyse. For sekundær transport blir transporten av et molekyl mot sin konsentrasjonsgradient drevet frem av energi som frigis ved at et annet molekyl samtidig blir transportert med sin konsentrasjonsgradient. Videre kan transportører deles inn i flere superfamilier, hvor solute carrier transportør (SLC)-familien og ATP-bindende kasett (ABC)-familien er de største og viktigste [17, 18].

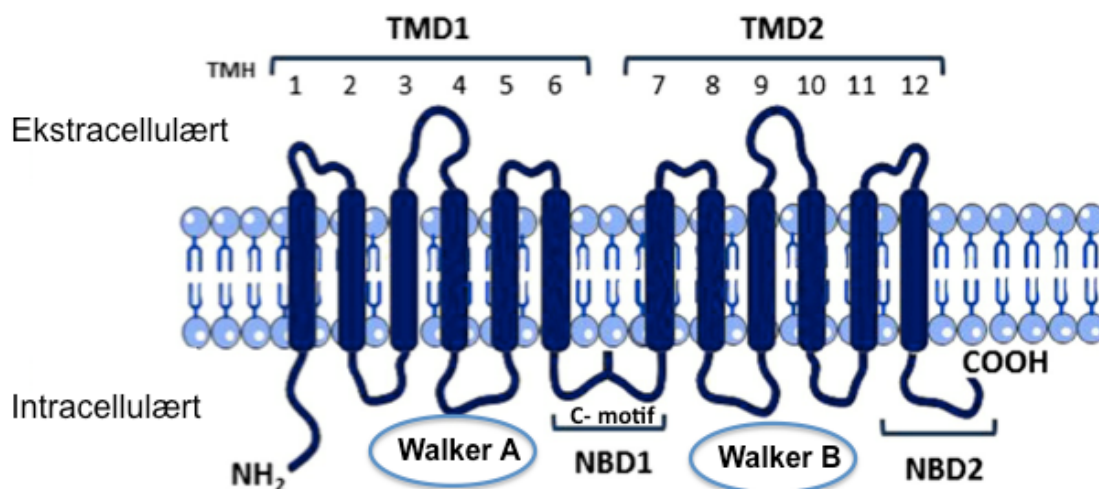
ABC-transportører er en stor gruppe membranproteiner som pumper sine substrater over biologiske membraner mot deres konsentrasjonsgradient ved bruk av energi som frigis ved ATP-hydrolyse [14]. Alle ABC-transportører har transmembrane domener og to nukleotidbindende domener, og de nukleotidbindende domenene er et fellestrekk for alle transportørene i denne familien [19]. De nukleotidbindende domenene binder og hydrolyserer ATP slik at energi frigjøres, og substratene kan transporteres gjennom kanalen som utgjøres av de hydrofobe transmembrane domenene [20]. Det er kartlagt 49 gener som koder for ABC-transportørproteinene, og de ulike proteinene i superfamilien kan deles inn i 7 ulike underfamilier med navnene ABCA-ABCG [18].

1.2.1 P-glykoprotein

Blant de best studerte transportørene i ABC-superfamilien er P-glykoprotein (kodet av *ABCB1*) [18]. På grunn av bred substratspesifisitet og lokalisering er P-gp en av de, klinisk sett, viktigste transportørene [21, 22]. P-gp beskytter vev for ulike xenobiotika og potensielle toksiske substanser, men transportøren kan også gi opphav til legemiddelresistens ved at legemidler som har sitt virkested intracellulært pumpes ut av cellen [23].

Struktur

P-gp består av 1280 aminosyrer og har molekylvekt på ca. 170 kDa. Transportøren er bygget opp av to homologe halvdelene som hver inneholder et nukleotidbindende domene og et transmembrant domene. Seks transmembrane helikser i en bestemt struktur utgjør hvert av de to transmembrane domenene i proteinet (figur 1) [24]. De to halvdelene er bundet sammen med et linker-peptid. Interaksjon mellom de to halvdelene er nødvendig for at P-gp kan utøve sin funksjon. NH₂-og COOH-terminalene, samt de nukleotidbindende domenene, er lokalisert intracellulært. Hver av de to nukleotidbindende domenene består av to sekvenser, *Walker A* og *Walker B*. Disse sekvensene inneholder ATPaser og her bindes ATP for så å bli hydrolysert. Denne prosessen frigir energi som er helt essensielt for P-gp aktivitet [21, 25]. Linkerregionen mellom *Walker A* og *Walker B* sekvensene kalles C-motif, og dette peptidet er spesifikt for ABC-transportører [26].



Figur 1: Strukturen til P-glykoprotein. Proteinet består av to homodimere halvdelene bestående av et transmembrant domene (TMD) bestående av seks helikser og et nukleotidbindende domene (NBD). De to nukleotidbindende domenene består av to sekvenser kalt Walker A og Walker B. Disse to sekvensene er separert med C-linker-region (C-motif). Den første ekstracellulære sekvensen av proteinet er N-glykosylert. Modifisert fra Zhou et al. og Silva et al. [21, 27].

Uttrykk

P-gp uttrykkes i flere celletyper og vev, blant annet i nyrer, lever, tarm og binyrer. Proteinene er lokalisert i cellemembranen på den siden som vender ut mot lumen [21]. Denne plasseringen av P-gp gjør at den er involvert i å beskytte celler mot toksiske substanser, ved at slike substanser blir pumpet ut av cellen og ut i tarmlumen eller ut i galle eller urin [28]. P-gp er også uttrykt i ulike vevsbarrierer som blod-hjerne-barrieren der proteinet beskytter sentralnervesystemet mot legemiddeleksponering [16]. Videre uttrykkes P-gp også i alle typer perifere blodceller, deriblant lymfocytter, der P-gp er vist å påvirke konsentrasjonen intracellulært til en rekke legemidler [29].

Funksjon og transportmekanisme

Legemiddelet binder seg til et av høyaffinitetsbindingssetene på de transmembrane domenene i proteinet. For at det skal skje en rask translokasjon av legemiddelet over membranen, må bindingssetet gå fra høyaffinitet til lavaffinitet for legemiddelet for å fremme transport av legemiddelet over membranen og ut på den andre siden [30]. Binding av legemiddelet til det substratbindende setet fører til binding av to ATP-molekyler til de nukleotidbindende domene (NBD) på P-gp. Denne bindingen av ATP fører til en konformasjonsendring av P-gp og en dimerisering av de to nukleotidbindende domenene [31]. Begge de to nukleotidbindende domenene er nødvendige for P-gp aktivitet. De fungerer som ATPaser, som hydrolyserer ATP slik at energi frigis, noe som er helt avgjørende for at P-gp skal kunne pumpe substratene over membranen [21]. Etter binding av ATP gjennomgår hele transportproteinene en konformasjonsendring, og de transmembrane domenene går over til en posisjon vendt ut mot den ekstracellulære delen av cellen, slik at substratet enkelt kan transporteres ut i den ekstracellulære væsken [31]. Etter hydrolyse av ATP frigis ADP fra NBD og transportøren går tilbake til utgangsposisjonen [18].

Substrater

Substrater for P-gp er ofte hydrofobe molekyler, og mange av disse er også kationer [32]. Blant annet er en rekke legemidler innen kreftbehandling, immunsuppresjonsbehandling og hypertensjonsbehandling substrater for P-gp (tabell 1). Mange av legemidlene har også overlappende substratspesifitet med CYP3A. Denne substratoverlappingen kan være viktig for legemiddelfordelingen i kroppen fordi P-gp og CYP3A4 ofte er uttrykt i de samme cellene, som for eksempel i enterocytter og hepatocytter [33]. For å kunne interagere med P-

gp antas det at substratene først må bevege seg inn i lipidlaget i membranen, for deretter spesifikt å interagere med det substratbindende setet [27].

Tabell 1: Oversikt over substrater, inhibitorer og indukere av P-glykoprotein. Modifisert fra Kim [33].

Substrater	Indusere	Inhibitorer
Aldosteron	Klotrimazol	Atorvastatin
Bilirubin	Dexametason	Cyklosporin
Cimetidin	Indinavir	Erytromycin
Cyklosporin	Johannesurt	Itrakonazol
Dexametason	Morfin	Karvedilol
Digoxin	Rifampin	Ketokonazol
Dilitiazem	Ritonavir	Metadon
Doxorubisin		Ritonavir
Erytromycin		Tamoksifen
Etoposid		Venlafaksin
Fexofenadin		
Indinavir		
Itrakonazol		
Kolkisin		
Kortisol		
Loperamid		
Metylprednisolon		
Morfin		
Paklitaksel		
Ranitidin		
Rhodamin		
Tetracyklin		
Verapamil		
Vinblastin		

1.3 Individuell variabilitet i P-gp

To parametere styrer aktiviteten til P-gp: Ekspresjonsnivået av *ABCB1* som kontrollerer hvor mye P-gp som blir syntetisert i celler, og funksjonaliteten til P-gp, som bestemmer hvilke substrater som kjennes igjen av proteinet og hvor effektivt P-gp transporterer substratet over membranen [34].

Genetiske polymorfismer i *ABCB1* og deres innvirkning på funksjon av proteinet har blitt studert av mange. Mutasjonen 3435C>T på ekson 26 er den best studerte polymorfismen, hvor denne genvarianten har blitt assosiert med redusert ekspresjon av P-gp [13, 35]. Flere har forsøkt å finne sammenheng mellom P-gp polymorfisme og kliniske endepunkt. Enkelte studier har vist en høyere eksponering av digoxin hos personer med T/T allel i forhold til de andre allelene [34, 36]. Det er imidlertid motstridende resultater på dette området. Gerloff et

al. viste med sin studie at de ulike variantene av ekson 26 ikke hadde innvirkning på absorpsjonskinetikken av digoxin, mens Sakaeda et al. målte en høyere serumkonsentrasjon av digoxin hos personer med C/C allel enn andre alleler [37, 38]. En metaanalyse har også rapportert at de ulike allelene ikke hadde innvirkning på kinetikken til digoxin [39]. Selv om effekten av polymorfismer i P-gp har liten innvirkning på systemisk eksponering av legemidler, finnes det studier som tyder på at lokal eksponering av legemidler er betydelig mer påvirket. En studie på MDR1a (-/-) ”knock-out” mus viste en 35 ganger høyere akkumulering av digoxin i hjernen hos disse musene sammenlignet med MDR1a (+/+). Det ble også observert en dobling i systemisk eksponering, noe som kan tyde på nedsatt eliminering av digoxin hos MDR1a (-/-) musene [40]. Det er fortsatt behov for ytterligere forskning på dette området, og den kliniske relevansen av *ABCB1* polymorfisme hos mennesker er fortsatt uklar [13].

Legemiddelinteraksjoner kan være en kilde til individuell variabilitet. Koadministrasjon av enkelte substanser kan føre til en induksjon eller inhibisjon av P-gp. Eksempler på indukere og inhibitorer av P-gp er gitt i tabell 1. En slik induksjon eller inhibisjon kan føre til endret legemiddelabsorpsjon og biotilgjengelighet av legemidler [21].

En annen viktig faktor bak individuell variabilitet er overekspresjon av P-gp. Overekspresjon av P-gp fører til reduksjon av intracellulær konsentrasjon av legemidler og andre substanser ved at disse substansene pumpes ut av cellen [41]. Ekspresjonen av P-gp blir mediert av MDR1 transkripsjonsfaktoren Y-boksbindende protein 1 (YB-1). Induksjon av denne transkripsjonsfaktoren kan skje ved bruk av legemidler og andre kjemiske substanser, men fysisk stress som røntgenstråling, ultrafiolett stråling og varmesjokk kan også inducere YB-1 aktivering. Ekspresjon av P-gp korrelerer sterkt med aktiviteten av YB-1, og ved økt YB-1 aktivering øker ekspresjon av P-gp [21, 42]. En økt ekspresjon av P-gp er blant annet observert hos pasienter med tumor, og en slik overekspresjon er assosiert med resistens mot kjemoterapi innen en rekke former for kreft, deriblant tarm-og leverkreft og leukemi [43].

Behandlingsresistens har også blitt observert hos pasienter med autoimmune sykdommer som revmatoid artritt og systemisk lupus erythematosus (SLE). Disse pasientene hadde økt aktivitet og ekspresjon av P-gp [22, 42]. Tsujimura et al. viste i en studie at cytokinet interleukin-2 (IL-2) aktiverer YB-1 som gir økt transkripsjon av *ABCB1* og dermed økt ekspresjon av P-gp i lymfocytter [42]. Samme forskningsgruppe viste i en senere studie at

uttrykket av P-gp var høyt i perifere CD4+, CD8+ og CD19+ celler hos pasienter med SLE sammenlignet med normale celler. Nivåene av P-gp i lymfocytene til disse pasientene korrelerte med sykdomsaktiviteten og var økt hos pasienter som responderte dårlig på kortisonbehandling. Studiene viste også at manglende respons på høydose kortikosteroider hadde en sammenheng med nivåer av P-gp [41]. En annen studie utført av Henmi et al. viste også at P-gp funksjonen var økt i CD4+ celler hos pasienter som hadde lav respons på kortisonbehandling i forhold til pasienter med god respons hos pasienter med systemisk lupus erythematosus [44]. I en gruppe pasienter med revmatisme viste Yudoh et al. at andelen av CD4+ celler som uttrykte P-gp var høyere hos pasienter med lav respons på de sykdomsmodifiserende legemidlene bucillamin og sulfasalazin [45].

Det er også vist oppregulering av P-gp mRNA-uttrykk i lymfocytter fra nyretransplanterte pasienter [46]. Immunsuppressiva har sitt virkested intracellulært i lymfocytter, og det kan tenkes at en oppregulering av P-gp kan påvirke den intracellulære konsentrasjonen av disse legemidlene, og dermed også påvirke deres immundempende effekt [35]. En studie utført av Falck et al. viste at intracellulær konsentrasjon av cyclosporin i T-lymfocytter sank tre dager før reaksjon. Hvilken rolle P-gp har i forhold til intracellulær konsentrasjon av cyclosporin er i midlertidig uklar [47].

1.4 Kvantifisering av P-glykoprotein

På grunn av legemiddeltransportørens viktige rolle innenfor legemidlers kinetikk vil en kvantifisering av transportørene være av interesse. En metode for kvantifisering av P-gp vil være et skritt på veien i forståelsen av P-gps påvirkning på effekt og kinetikk av legemidler. Det vil også kunne være et nyttig verktøy for å kunne forutse individuell respons av legemidler som er substrater for P-gp [48, 49]. Genetisk testing kan indikere at proteinet er tilstede i vev, men på grunn av dårlig korrelasjon mellom mRNA og nivå av protein kan lite av variasjonen forklares på bakgrunn av genetikk [50]. Vanlige metoder som benyttes for bestemmelse av proteiner er ELISA, Western blotting, fluorescens mikroskopering og flow cytometri [28, 51]. Felles for de nevnte metodene er at de er enten kvalitative eller semikvantitative, og gir ikke et absolutt kvantitativt svar på nivå av P-gp i vev. Det er sterkt ønskelig å kunne måle mengden av transportøren i enheter som per celle eller per gram vev [28]. Ingen av de metodene nevnt over gir denne muligheten.

En alternativ metode for kvantifisering av proteiner med massespektrometer har derfor blitt undersøkt. Analyse av proteiner ved bruk av LC-MS/MS proteomikk gir en sensitiv og nøyaktig analyse [52]. Proteomikk omhandler studier av uttrykte proteiner i en organisme [53]. En vanlig fremgangsmåte for analyse av proteiner med MS er ”bottom-up” analyse. Ved denne fremgangsmåten benyttes det en protease som kløyver proteinet til mindre peptider. Et peptid som er unikt for moderproteinet (signaturpeptid) kan deretter kvantifiseres med MS, og mengden av signaturpeptidet vil representere mengden av moderproteinet i prøven. Det kan også utføres analyse av intakte proteiner som ikke har gjennomgått kløyving med proteaser på forhånd. Denne strategien kalles for ”top-down” [54].

1.5 utfordringer knyttet til membranbundne proteiner

Det er flere utfordringer ved analyse av membranproteiner ved bruk av proteomikk. Membranproteiner uttrykkes i liten grad i forhold til andre proteiner i proteomet. For at analyse av proteinene skal være mulig må proteinet i prøven oppkonsentreres. En annen utfordring er membranproteinenes hydrofobisitet. Membranproteiner inneholder som regel 1-20 hydrofobe deler som spanner over membranen [55]. Disse domenene gjør proteinene hydrofobe og vanskelige å løse i vandige buffere. Flere metoder kan benyttes for å løse dette problemet, blant annet bruk av organiske syrer og løsemidler, samt surfaktanter. Bruk av surfaktanter er den beste måten å øke løseligheten til membranproteiner på ettersom de er amfifile og kan skape et miljø som minner om fosfolipidlaget i cellemembranen [56]. I denne oppgaven ble digitonin, som er en ikke-ionisk surfaktant, benyttet [57].

1.6 Prøveopparbeidelse

For å kunne kvantifisere lave konsentrasjoner av proteiner i en prøve må prøven gjennomgå en prøveopparbeidelse for å redusere kompleksiteten i prøvene, slik at en analyse med LC-MS/MS er mulig. Det finnes flere måter å utføre en prøveopparbeidelse på, men felles mål er å fjerne elementer som kan forstyrre analysen og oppkonsentrere prøven for oppnå en høyere sensitivitet [52].

Homogenisering av celler

Homogenisering av celler er et viktig trinn for å kunne isolere ønsket protein fra biologiske prøver. Homogenisering medfører at membranen knuses og deles opp i flere fragmenter. Ulike metoder kan benyttes til å homogenisere celler. Dounce homogenisator, Tenbroeck homogenisator og Potter-Elvehjem homogenisator er eksempler på metoder for

homogenisering basert på morter-pistillprinsippet. Denne typen homogenisering passer for myke vev. Sonikering er en annen homogeniseringsmetode. Høyfrekvente bølger rettes direkte mot prøven og skaper et trykk og kraftig vibrering slik at små hulrom dannes i prøven. Når disse hulrommene sprekker sendes det ut en trykkbølge slik at celler homogeniseres. Homogenisering med "bead-beaters" er en annen effektiv metode for homogenisering av flere ulike typer vev [58].

"Bead-beating"

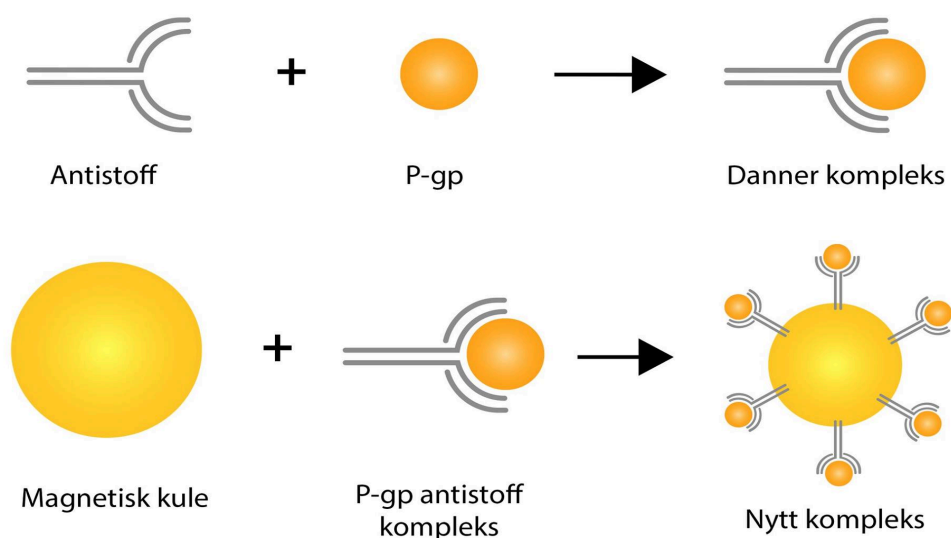
Precellys®24 er en type "bead-beater", og kan brukes til å homogenisere en rekke type biologiske materialer. Prøven og en passende buffer tilsettes rør som inneholder små kuler av glass, keramikk eller rustfritt stål. Kulenes diameter varierer fra 0,1 mm til 6,8 mm. Rørene kan romme et innhold på 0,5 ml, 2 ml og 7 ml. Størrelsen på rørene, diameteren på kulene og kulemateriale kan varieres avhengig av hva slags type biologisk materiale som ønskes homogenisert. Prøvene plasseres deretter i Precellys®24 der prøvene utsettes for kraftig risting slik at kulene settes i bevegelse og ødelegger materialet i prøvene (figur 2). Opptil 24 prøver kan homogeniseres samtidig, og hastighet (rpm), antall sykluser og tid per syklus kan stilles inn etter hva slags prøvemateriale som skal homogeniseres [59].



Figur 2: Homogenisering med Precellys®24. Prøvemateriale overføres til små rør som plasseres i maskinen. Rørene utsettes for kraftig risting slik at kulene i rørene settes i bevegelse og knuser materiale i rørene.

Immunoekstraksjon

Ved å benytte immunoekstraksjon med utvalgte antistoffer kan ønsket protein spesifikt renses og oppkonsentreres fra resten av prøven. Antistoffene tilsettes prøven og danner et antistoff-antigenkompleks med proteinet. Dette komplekset kan deretter kobles på magnetiske kuler. Et nytt antistoff-antigen-magnetkompleks vil dannes. Prøven kan så settes på en magnet som vil sørge for at antistoff-antigen-magnetkomplekset sitter fast mens supernatant med forurensninger kan fjernes fra prøven (figur 3). På denne måten vil proteinet oppkonsentreres og prøven renses. Denne fremgangsmåten kalles indirekte immunoekstraksjon til forskjell fra direkte immunoekstraksjon der antistoffene først kobles til de magnetiske kulene. Deretter kobles ønsket analytt til antistoff-magnet-komplekset, og prøven kan renses på samme måte som for indirekte immunoekstraksjon.



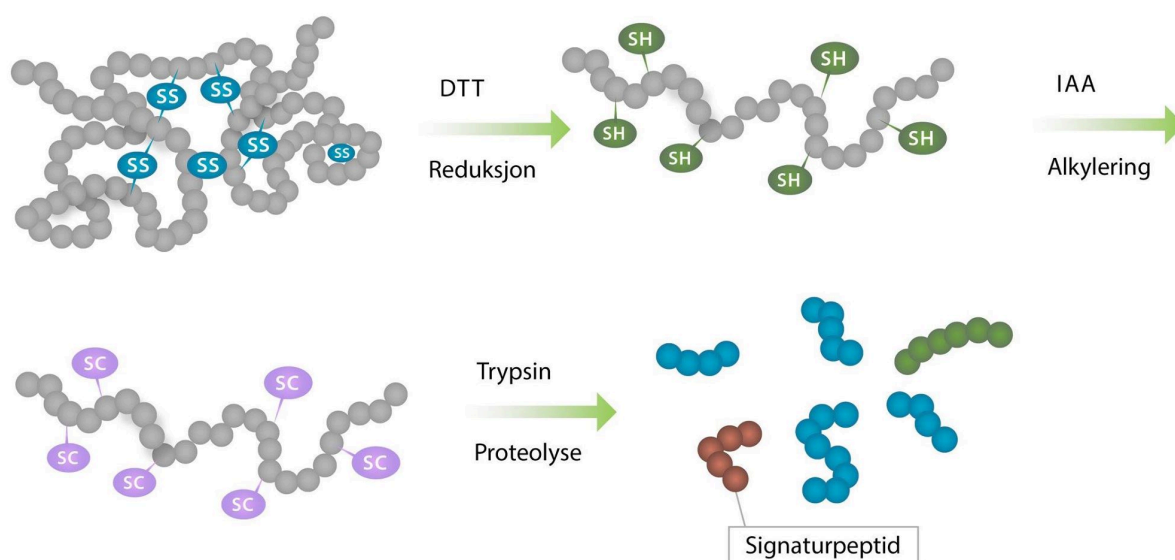
Figur 3: Prosedyre for indirekte immunoekstraksjon. Antistoffene binder seg til P-gp og danner et antistoff-antigenkompleks. Antistoff-antigenkomplekset kobles så til de magnetiske kulene og danner et magnet-antistoff-antigenkompleks. På denne måten festes P-gp på kulene og supernatant med forurensninger kan fjernes fra prøven.

Proteolyse

Store molekyler som proteiner kan ikke analyseres direkte. En del av prøveoppbeidelsen må derfor inkludere proteolyse av proteinet slik at mindre peptidfragmenter dannes [52]. Trypsin er den mest brukte proteasen til dette formålet. Trypsin hydrolyserer proteiner på karboksylsiden av aminosyrene lysin eller arginin, når ingen av disse er etterfulgt av prolin. Blant peptidene som dannes etter proteolyse velges et signaturpeptid som bestemmes ved LC-MS/MS. Signaturpeptidet må ha en passende retensjonstid og signalkvalitet. At peptidet

er stabilt og reproducerbart (det vil si at proteinet klippes fullstendig på det aktuelle stedet hver gang) er også kriterier som bør tas hensyn til ved valg av signaturpeptid. Peptidet må også være unikt for moderproteinet som ønskes kvantifisert [50].

En effektiv proteolyse av proteinet er avgjørende for at signaturpeptidet skal kunne kvantifiseres [50]. En ødeleggelse av proteinets tertiære og sekundære struktur er et viktig trinn for at proteolyse av proteinet kan utføres. Dithiothreitol (DTT) reduserer disulfidbindingene i proteinet og sørger for en komplett utfolding av proteinet. For å hindre reformasjon av disulfidbindingene alkyleres cysteindelenene av sulfidbindingene med jodeddiksyre (IAA) før proteolyse [52] (figur 4).



Figur 4: Proteolyse av proteinet. Proteinets struktur holdes sammen ved hjelp av disulfidbindinger. Dithiothreitol (DTT) tilsettes for å ødelegge bindingene. For å hindre at bindingene redannes tilsettes jodeddiksyre (IAA). Til slutt tilsettes trypsin som sørger for proteolyse av proteinet til mindre peptider. Et av disse peptidene velges som signaturpeptid for P-gp.

Fast-fase ekstraksjon

Fast-fase ekstraksjon er en separasjonsmetode som baserer seg på de ulike kjemiske og fysiske egenskapene til ulike forbindelser. Ved fast-fase ekstraksjon introduseres prøven til et fast stoff (sorbent), og stoffet vil enten festes til sorbenten eller slippes gjennom med væsken [60]. For at forbindelsen skal festes til sorbenten må sorbenten ha funksjonelle grupper på overflaten som gir sterkere interaksjon mellom stoff og sorbent enn stoff og væske. På denne måten oppnår man en separasjon av ønsket prøvemateriale og andre forurensninger.

Ekstraksjonsprosessen foregår i fire trinn. Først kondisjoneres kolonnene for å aktivere de funksjonelle gruppene på sorbenten. I utgangspunktet er sorbenten tørr og de funksjonelle gruppene ligger flatt langs overflaten. Kondisjonering får de funksjonelle gruppene til å reise seg slik at prøveløsningen kommer i god kontakt med den aktive overflaten. Til denne prosessen benyttes løsemidler. Deretter settes prøven på kolonnen i et ønsket volum. Stoffene i prøven vil fordele seg mellom den aktive overflaten på sorbenten og prøveløsningen. Hovedmålet er at ønsket analytt skal fanges opp av sorbenten, mens prøveløsningen med forurensinger samles og kastes. For at dette kan oppnås må prøveløsningen ha en svak løsemiddelstyrke. Etter prøvepåsetting vaskes sorbenten for andre forurensinger og komponenter som har lavere bindingsgrad til sorbenten enn analytten. Til slutt elueres analytten av sorbenten med et løsemiddel med såpass stor løsemiddelstyrke at alle bindinger mellom analytt og sorbent brytes. Løsemiddelstyrken bør være såpass sterk at analytten kan elueres i et lite volum. Elueringsmiddelet bør derimot ikke ha for sterk løsemiddelstyrke, da kan forurensninger som er bundet sterkere enn analytten følge med [61].

1.7 Apparatur for analyse: HPLC-MS/MS

HPLC

Analytten er løst i væske som injiseres i en væskestrøm (mobilfase). Mobilfase med analytt presses gjennom en kolonne hvor stoffene retarderes og separeres. Det vanligste separasjonsprinsippet er omvendt-fase-kromatografi. I omvendt-fase-kromatografi er kolonnen der stoffene retarderes hydrofob. Kolonner med octadecyl-(C18-) materiale er mest brukt til dette formålet. Stoffene retarderes ved hydrofobe interaksjoner, som vil si at polare og lite hydrofobe stoffer får minst retardasjon og kort retensjonstid [61].

Mobilfasen sørger for å bringe stoffene som ønskes analysert gjennom kolonnen og ut til detektoren. Mobilfasen som benyttes i omvendt-fase-kromatografi er blandinger av vann og organiske løsemidler. Ved å justere mengden av organiske løsemidler kan styrken på mobilfasen styres. Dersom det tilsettes større mengder løsemidler, øker styrken på mobilfasen og retensjonen minker. Acetonitril og metanol er to organiske løsemidler som ofte benyttes [61].

Detektor: Massespektrometer (MS)

Et massespektrometer måler massen til ulike forbindelser ved hjelp av masse-ladningsratio (m/z). For at dette skal være mulig må molekylene ha en ladning. Det utføres ved at

molekylene blir tilført enten positiv eller negativ ladning i massespektrometeret. Når væskekromatografi er koblet med MS-detektor er elektronsprayionisasjon (ESI) en vanlig teknikk for ionisering av molekyler. Stoffene føres med en væskestrøm gjennom et kapillærrør og inn i massespektrometeret. Ved utgangen av kapillærrøret utsettes væskestrømmen for N₂-gass slik at det dannes en aerosol. En elektrode sørger for at de små dråpene i aerosolen får elektrisk ladning. Deretter dampes væskestrømmen bort med N₂-gass, mens analyttmolekylene, som fortsatt har ladning, vil transporteres inn i masseanalysatoren ved hjelp av elektrisk spenning. I masseanalysatoren separeres ionene etter forholdet mellom masse og ladning, før en detektor gir informasjon om mengden ioner som dannes og hvilken masse ionene har [61, 62]. I denne oppgaven ble en Orbitrapdetektor benyttet. Orbitrapdetektoren har høy grad av massenøyaktighet og høy oppløsning, noe som skiller den fra andre detektorer. Ved analyse vil først analytten ioniseres ved hjelp av en elektronspray ionekilde. Analytten transporteres videre gjennom flere trinn til en ionefelle, kalt "C-trap". Her akkumuleres ionene før de injiseres inn til Orbitrapanalysatoren, hvor masse over ladning bestemmes (m/z) [63].

1.8 Hensikt med oppgaven

P-gp er et transportprotein som blant annet er uttrykt i T-lymfocytter. Flere immunsuppressiva som har sitt virkested intracellulært i lymfocytene er substrater for P-gp. Det er vist at P-gp i lymfocytter oppreguleres ved inflammasjon, og dette kan gi opphav til resistens mot immunsuppressiva. Konsekvenser av dette for transplanterte pasienter kan være nedsatt immunsuppresjon med fare for akutt rejeksjon. En kvantifisering av P-gp i lymfocytter vil være et nyttig hjelpemiddel for å forstå sammenhengen mellom uttrykk av P-gp og immunsuppresjon. Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en LC-MS/MS basert metode for kvantifisering av P-gp i lymfocytter fra fullblod.

2 Materialer og metode

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Leverandør
Acetonitril, hypergrade for LC-MS ($\geq 99,9\%$)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat (ABC) ($\geq 99,0\%$)	Sigma Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Complete mini proteaseinhibitor cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland
Complete mini proteaseinhibitor cocktail ETDA free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland
Digitonin	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
DL- dithiothreitol (DTT) ($\geq 99,0\%$)	Sigma Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Fosfatbufret saltvann uten kalsium og magnesium (PBS)	BioNordika, Norge
Jodeddiksyre (IAA) ($\geq 99,0\%$)	Sigma Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Maursyre, for LC-MS ($\sim 98\%$)	Sigma Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Metanol, for LC-MS ($\geq 99,9\%$)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Nitrogengass (N_2)	AGA Progas A/S, Oslo, Norge
Transfekterte insektscellemembraner (<i>ABCBI</i>)	B.D Bioscience, San Jose, California, USA
Trifluoreddiksyre ($\geq 98\%$)	Sigma Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Trypsin fra bovin pankreas	Sigma Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Tryptanblått	Sigma Aldrich inc., St. Louis, MO, USA

2.1.2 Utstyr

Utstyr	Produsent
Blodprøvetappingsutstyr	Nål: BD and company Holder: BD and company, Plymouth, UK
Bordsentrifuge	Labnet international Inc., Woodbridge, NJ, USA

Countess™ celleteller	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Corning sentrifugerør (15 og 50 ml)	Corning Inc., MA, USA
Dynabeads® Protein G magnetiske kuler	Life Technologies, Norge
DynaMag™-2 Magnet	Life Technologies, Norge
Eppendorf safe-lock rør (2,0 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)-rør, 6 mL	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Østerrike
Falcon-rør (14 mL)	BD Biosciences, San Jose, California, USA
Heraeus Fresco 21 sentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Tyskland
Heraeus Megafuge 16R-sentrifuge	Thermo Scientific, IL, USA
HulaMixer™	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Hvite korker til vialer	Holger Teknologi AS, Oslo, Norge
Inserts (31 x 6 mm, 0,1 mL)	VWR international, Leuven, Belgia
Leucoseprør	Greiner Bio-One, North America Inc., Monroe, NC, USA
Pipettespisser (wide mouth) Finntip®	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Precellys®24	Bertin Corp, Rockville, MD, USA
Precellys lysingkit: Tough micro-organism lysing kit VK05 - 0,5mL	Saveen&Werner, Sverige
Precellys lysingkit: Soft tissue homogenizing CK14 - 0,5 ml	Saveen&Werner, Sverige
Precellys keramiske kuler 2,8 mm	Bertin Corp., Rockville MD, USA
Protein LoBind 1,5 ml eppendorfrør	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Silika C8 materiale til fast-fase-ekstraksjon	Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA
ThermoMixer® F 1.5	VWR international, Leuven, Belgia
Tomme rør til Precellys lysing kits	Bertin Corp., Rockville MD, USA
Sartorius vekt	VWR international, Leuven, Belgia
Mettler Toledo vekt	Mettler Toledo, Sveits
Vialer (32 x 11,6 mm)	Matriks AS, Oslo, Norge
Wirlmikser MS 3 Basic	IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA

Utstyr til LC-MS/MS:

Ultimate 3000 system bestående av:

Pumpe: LPG-3x00 micropump	Dionex corp, Sunnyvale, CA, USA
Autosampler: WPS3000RS	Dionex corp, Sunnyvale, CA, USA
Flow manager: FLM 3300	Dionex corp, Sunnyvale, CA, USA
LTQ XL ionefelle MS	Thermo, San José, CA, USA
LTQ-Orbitrap-MS	Thermo, San José, CA, USA
Separasjonskolonne (Acclaim PepMap® 100 15 cmx75 µm, nanoViper)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Programvare: Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

2.1.3 Løsninger

P-gp standard i PBS	3 µl P-gp standard løses i 47 µl PBS og blandes på wirlmikser. PBS tilsettes til et totalvolum på 300 µl og blandes på risteblokk i 5 minutter ved 1000 rpm
P-gp standard i ABC	3 µl P-gp standard løses i 47 µl ABC og blandes på wirlmikser. ABC tilsettes til et totalvolum på 300 µl og blander på risteblokk i 5 minutter ved 1000 rpm
Complete mini proteaseinhibitor stamløsning	1 tablett Complete mini løses i 1,5 ml PBS
Complete mini proteaseinhibitor EDTA free stamløsning	1 tablett Complete mini EDTA free løses i 1,5 ml PBS
Digitonin 600 µg/ml	12 mg digitonin veies ut og løses i 20 ml PBS
Ammoniumbikarbonat-buffer (ABC-buffer)	40 mg ABC veies og løses i 10 ml mQ-vann umiddelbart før bruk

100 mM Dithiothreitol (DTT)	15,4 mg DTT veies inn og står på is til det løses i 1 ml ABC umiddelbart før bruk
500 mM jodeddiksyre (IAA)	46,5 mg IAA veies inn og står på is med aluminiumsfolie rundt til det løses i 0,5 ml ABC umiddelbart før bruk
0,1 mg/ml Trypsin	1 mg trypsin veies inn og står på is til det løses i 1 ml ABC umiddelbart før bruk. Fra denne løsningen tas det ut 100 µl til et nytt eppendorfrør og blandes med 900 µl ABC.
20 mM HCOOH	75,4 µl 100% maursyre blandes i 100 ml mQ- vann. Holdbar i 3 måneder
10% trifluoreddiksyre (TFA)	En ampulle TFA blandes med 9 ml mQ- vann. Holdbar i 1 måned
0,1% TFA	100 µl 10% TFA blandes med 9,9 ml mQ- vann. Holdbar i 1 uke
80% ACN: 20% 0,1% TFA	800 µl ACN blandes med 200 µl 0,1% TFA umiddelbart før bruk

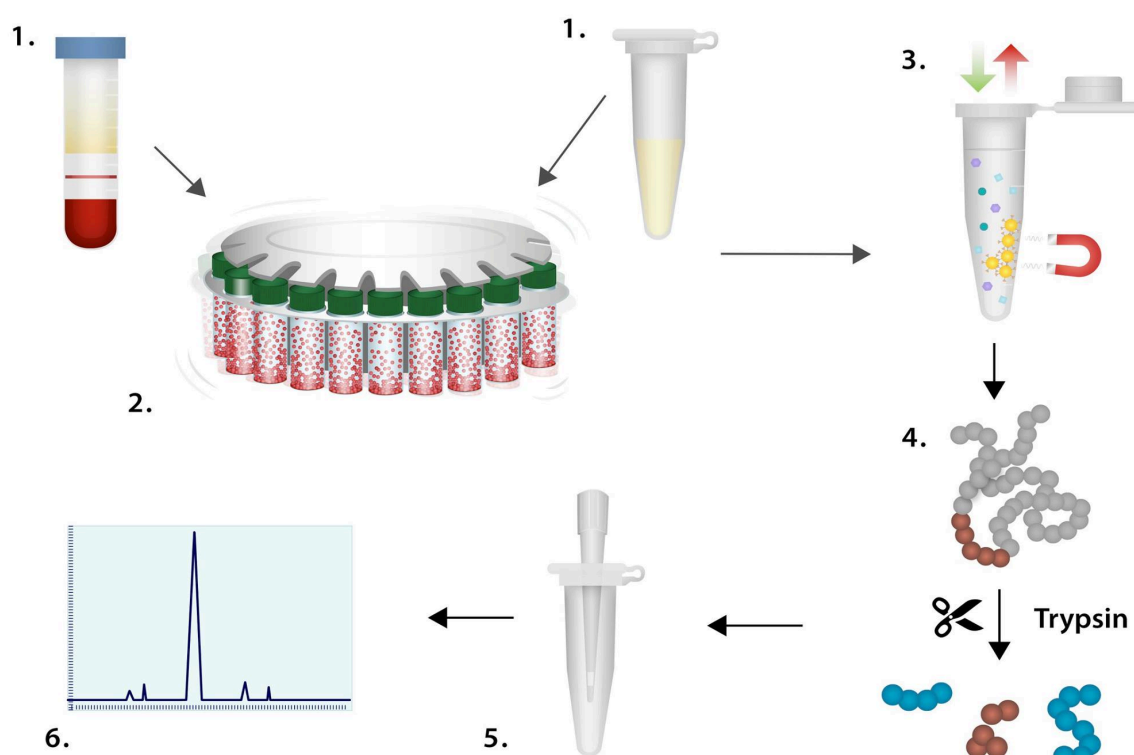
Til LC-MS/MS

Mobilfase A	<p>95% mQ- vann, 5% ACN, maursyre 0,1% av vannmengden</p> <p>Til 500 mL:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 475 ml mQ-vann - 25 ml ACN (hypergrade for LC-MS) - 475 µl maursyre (for massespektrometri)
-------------	--

Mobilfase B	<p>95% ACN, 5% mQ- vann, maursyre 0,1% av vannmengden.</p> <p>Til 500 ml:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 475 ml ACN - 25 ml mQ- vann - 25 µl maursyre (for massespektrometri)
Loadingbuffer	500 ml mQ- vann, 377 µl maursyre, 10 ml ACN (hypergrade for LC-MS)
Vaskeløsning	50% metanol, 50% mQ- vann. Til 500 ml: 250 ml metanol og 250 ml mQ- vann

2.2 Metode

Figur 5 viser en skjematisk oversikt over prøveopparbeidelse, oppkonsentrering og analyse av perifere mononukleære celler (PBMC) og/eller P-gp standard. Som standard ble det benyttet cellemembraner fra insektceller transfektert med humant *ABCB1* (P-gp), levert fra BD Biosciences (5 mg/ml totalt proteininnhold). For opprensing av prøven ble det brukt indirekte immunoekstraksjon. Proteolyse av P-gp ble utført ved bruk av trypsin, og en oppkonsentrering og opprensing av prøven ble gjort ved fast-fase ekstraksjon. Analyse ble utført ved bruk av LC-MS/MS Orbitrap.

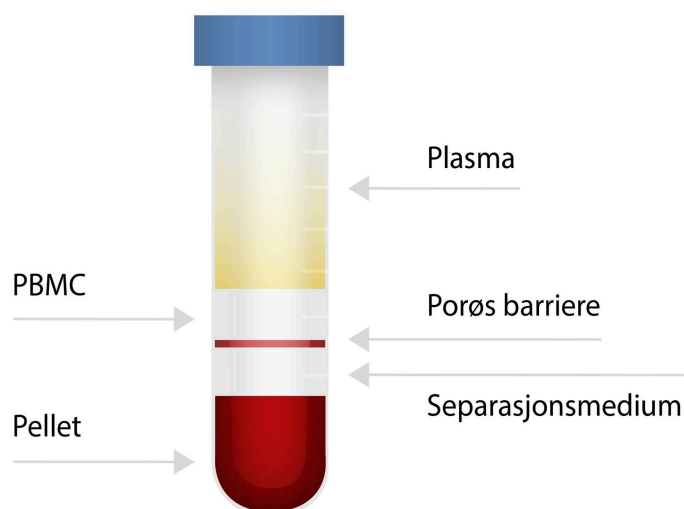


Figur 5: Skjematisk oversikt over prosedyren. 1. PBMC ble isolert fra fullblod ved bruk av Leucoseprør. P-gp standard ble tint og resuspendert. 2. Celler og/eller P-gp standard, antistoffer og PBS ble tilsatt Precellysør og ble homogenisert ved bruk av Precellys®24. 3. Prøven ble oppkonsentrert og renses ved indirekte immunoekstraksjon. 4. Proteolyse av proteinet ble utført ved bruk av trypsin. 5. Opprensing av prøven ble gjort ved fast-fase ekstraksjon. 6. Tilslutt ble prøven analysert ved LC-MS/MS Orbitrap.

2.3 Isolering av perifere mononukleære celler fra fullblod

Fullblod fra friske frivillige ble tappet i 6 ml EDTA-rør. EDTA-rørene ble vendt opp og ned 5 ganger før 4 ml fullblod ble tilsatt 14 ml Falconrør. Fullblodet ble fortynnet 1:1 ved å tilsette 4 ml kald PBS til Falconrøret og blande forsiktig. Det fortynnede fullblodet ble

forsiktig helt over i Leucoseprør og rørene ble sentrifugert i romtemperatur ved 1000 g i 10 minutter med retardasjonsgrad 4. Det ble benyttet sentrifuge med innsats som svinger utover (Megafuge). Etter sentrifugering ble de ulike bestanddelene av blodet delt inn i ulike sjikt i Leucoseprøret (figur 6). Videre ble plasma fjernet fra rørene og sjiktet med PBMC ble pipettert ut i nye Falconrør. Cellene ble vasket ved å forsiktig tilsette 10 ml PBS og rørene ble vendt forsiktig 6 ganger. Alle rørene ble så sentrifugert på nytt ved 300 g i 10 minutter ved romtemperatur. Supernatanten ble helt av og cellepelleten ble reløst i 1 ml PBS. Innholdet i to og to rør ble slått sammen før celletelling. Til celletelling ble 10 µl cellesuspensjon blandet med 10 µl tryptanblått i et eppendorfrør, og 10 µl av denne blandingen ble tilsatt cellekammeret. Til telling ble det benyttet automatisert celleteller (Countess™ Automated cellcounter). Etter celletelling ble cellene fordelt i protein LoBin eppendorfrør slik at antall celler per rør var ca. 5×10^6 . Celleløsningen ble sentrifugert ved 300 g i 10 minutter (Fresco 21) i romtemperatur før supernatanten forsiktig ble fjernet uten å få med noen celler. Cellene ble lagret ved -20°C til senere bruk.



Figur 6: Illustrasjon av Leucoseprør etter separasjon av de ulike komponentene i blod. Plasma og PBMC ligger i øverste sjikt, mens erythrocytter og granulocyttar samles nederst i røret som en pellet. Modifisert fra Ahlsen [64].

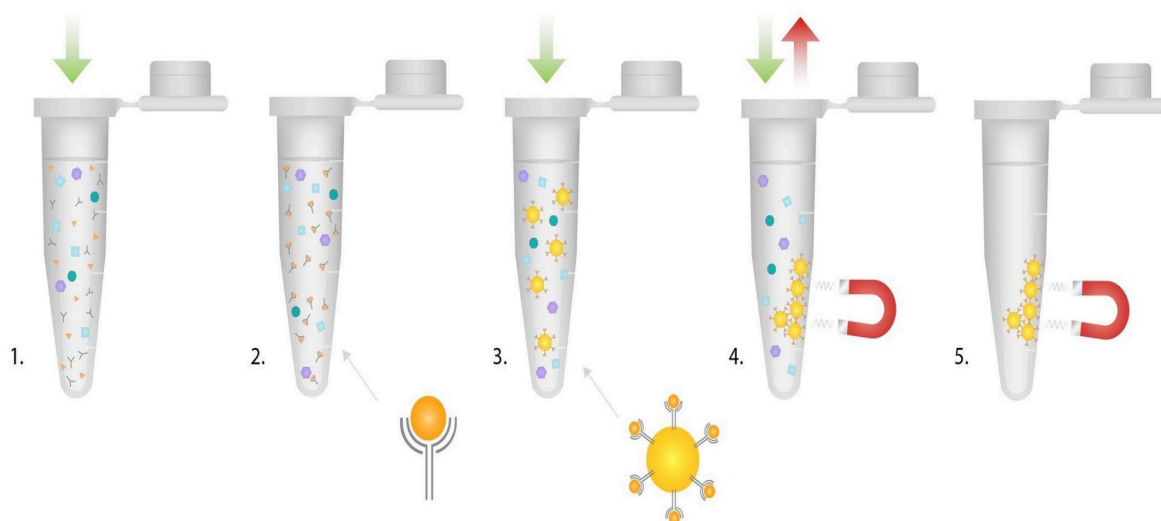
2.4 Repeterbarhet av uttak av standard

Standarden består av membranfragmenter i suspensjon og er ikke en homogen blanding. Før uttak av standard til prøvene må cellesuspensjonen resuspenderes. Repeterbarheten av uttakene ble undersøkt ved å ta ut 1 µl og 0,2 µl til hver prøve. Til prøvene med 1 µl standard

ble først 7 µl av celleduspensjonen pipettert ut i protein LoBin eppendorfrør, og fortynnet med 693 µl ammoniumbikarbonatbuffer. Løsningen ble blandet sammen på wirlmikser. Det ble så tatt ut 100 µl til nye protein LoBin eppendorfrør. For uttak av 0,2 µl ble det laget en stamløsning av 3,2 µl standard i 316,8 µl i ammoniumbikarbonatbuffer. Det ble overført 3,2 µl standard til et eppendorfrør og deretter ble 46,8 µl ABC-buffer tilsatt. Løsningen ble blandet på wirlmikser og deretter ble det resterende volumet av ABC-buffer tilsatt. Før uttak ble stamløsningen blandet sammen på risteblokk i 5 minutter ved 1000 rpm. Deretter ble det tatt ut 20 µl av stamløsningen til hver prøve. Denne fremgangsmåten for uttak av P-gp standard ble benyttet i senere forsøk. Det ble laget seks paralleller av hver prøve. For å unngå at andre faktorer i metoden kunne være en kilde til variasjon i uttak ble det kun utført proteolyse av disse prøvene før fast-fase ekstraksjon og analyse med LC-MS/MS Orbitrap ble utført.

2.5 Indirekte immunoekstraksjon

For oppkonsentrering og rensing av prøvene ble indirekte immunoekstraksjon med magnetiske kuler dekket med protein G (Dynabeads®) utført. Prøvene med celler og/eller P-gp standard, antistoffer og PBS ble etter homogenisering tilsatt 67 µl 600 µg/ml digitonin slik at prøvevolumet ble totalt 200 µl. Total konsentrasjon av digitonin i prøvene var 200 µg/ml [65]. Deretter ble prøvene satt til inkubering på HulaMixer® i 30 minutter i romtemperatur slik at antistoff-antigenkompleks ble dannet. Kulene ble samtidig preparert ved resuspending av kulesuspensjonen i 5 minutter på HulaMixer® i romtemperatur. Deretter ble 25 µl av kulesuspensjonen overført til protein LoBin eppendorfrør. Rørene ble plassert i et stativ og satt på en magnet slik at supernatant kunne fjernes. Kulene ble så tatt av magneten og vasket med 200 µl PBS. Deretter ble kulene igjen plassert på magneten og supernatant ble fjernet mellom hver vask. Kulene ble vasket totalt to ganger. Antistoff-antigenkomplekset ble så tilsatt kulene, og løsningen ble satt til inkubering på HulaMixer® i 15 minutter i romtemperatur. Etter inkubering ble prøvene plassert på magneten og supernatanten ble fjernet og kastet (figur 7). De magnetiske kulene ble vasket med 200 µl PBS i tre omganger. Til vask av kule-antigen-antistoffkompleks ble det benyttet wide-mouth pipettespisser.



Figur 7: Indirekte immunoekstraksjon. 1. Antistoffer tilsettes prøven. 2. Antistoffene danner antistoff-antigenkompleks med P-gp. 3. Antistoff-antigenkomplekset festes på de magnetiske kulene og danner et nytt kompleks. 4. Prøven plasseres på magnet. De magnetiske kulene festes til veggen av eppendorfrøret, slik at forurensninger kan fjernes fra prøven. Kulekomplekset vaskes med PBS for å fjerne ytterligere forurensninger. 5. Proteinene er isolert fra prøven. Figur modifisert fra Jensen [65].

Antistoffer

To ulike antistoffer, UIC-2 (Millipore, 1 mg/ml) og JSB-1 (Invitrogen, 83,30 mg/l og 166,67 mg/l) som binder seg henholdsvis til epitoper på ekstracellulær og intracellulær del av proteinet, ble benyttet. Begge antistoffene er mus-anti-MDR1 monoklonale antistoffer. Det ble benyttet 0,3 µg av hvert antistoff til metoden [65]. Det ble pipetert ut 3,6 µl JSB-1 direkte for antistoffet levert med konsentrasjon 83,30 mg/l, mens det ble laget en 1:1 fortykning i PBS for antistoffet levert med konsentrasjon 166,67 mg/l. Fra denne fortykningen ble det pipetert ut 3,6 µl til prøvene. For UIC-2 antistoffet ble det laget en fortykning i PBS slik at konsentrasjonen ble 0,1 mg/ml. Fra denne løsningen ble det benyttet 3 µl til hver prøve.

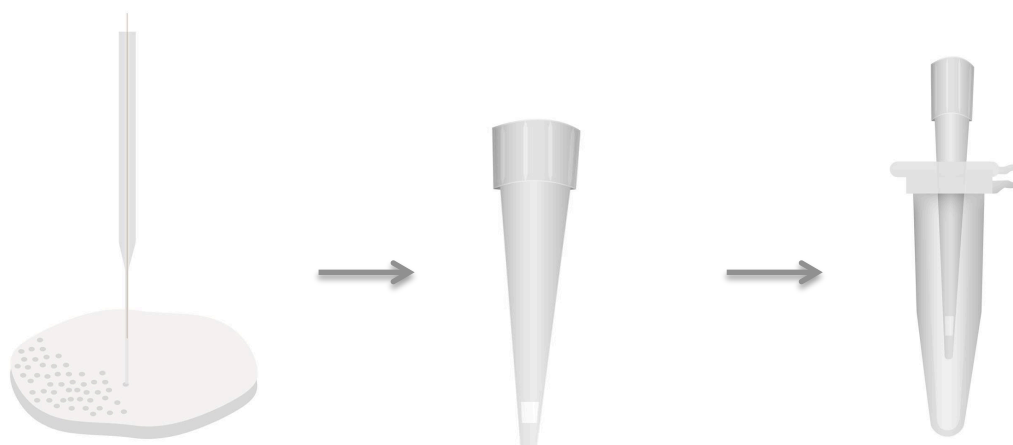
2.6 Proteolyse

Før proteolyse ble prøvene reløst i 100 µl ammoniumbikarbonatbuffer. Deretter ble det tilsatt 11 µl 100 mM dithiothreitol og prøvene ble blandet raskt på wirlmikser. Etter tilsetting ble prøvene satt til inkubering i varmeskap ved 37°C i 30 minutter. Denne prosessen fører til at disulfidbindingene i proteinet brytes. Etter inkubering ble det tilsatt 12 µl 500 mM jodeddiksyre for å forhindre reformering av disulfidbindingene. Prøvene ble satt mørkt i 45

minutter i romtemperatur. Proteolyse ble utført ved tilsetning av 12,5 µl 0,1 mg/ml trypsin. Etter tilsetning ble det blandet forsiktig med pipette. Prøvene ble satt til inkubering på varme- og risteblokk 37°C ved 1200 rpm i 2 timer eller over natten etter hva som var mest praktisk de ulike forsøksdagene [65]. Etter inkubering ble proteolysen stanset ved å tilsette 10 µl 200 mM maursyre. Før opparbeiding med fast-fase ekstraksjon ble de magnetiske kulene fjernet. Etter proteolyse er proteinene ikke lenger intakte. Fjerning av kuler vil ikke påvirke P-gp-peptidene som befinner seg i supernatanten.

2.7 Fast-fase ekstraksjon

Før opprensing av prøvene ble det benyttet selvlagde kolonner i 200 µl pipettespisser. Seks ringer av C8 silikamateriale ble stukket ut med glasspipette før kolonnemateriale ble stanset ut i pipettespissen ved bruk av ståltråd. Pipettespissene med kolonnemateriale ble plassert i lokket på 2 ml eppendorfrør, hvor det på forhånd hadde blitt laget hull med skrutrekker (figur 8). Kolonnene ble først kondisjonert ved tilsetning av 100 µl acetonitril. Prøvene ble sentrifugert i 2 minutter ved 2100 g. Sentrifugeringshastigheten var den samme gjennom hele prosedyren. Deretter ble 100 µl 20 mM maursyre tilsatt og prøvene ble sentrifugert i 2 minutter. Prøvene ble så satt på kolonnene og sentrifugert i 3 minutter. Etter prøvepåsetting ble kolonnene vasket med 100 µl 20 mM maursyre og sentrifugert i 2 minutter. Dersom ikke all væsken ble presset gjennom kolonnen ble prøvene sentrifugert noe lenger. Før eluering ble kolonnene satt i nye 1,5 ml LoBin eppendorfrør. Eluering ble deretter utført med 100 µl 80% acetonitril og 20% 0,1% trifluoreddiksyre. Til sist ble elueringsmiddelet dampet av på varmeblokk ved 60°C med nitrogen-gass. Prøvene ble oppbevart ved -20°C frem til analyse.



Figur 8: Tillagning av fast-fasekolonne. 6 ringer av C8 silikamateriale stikkes ut med glasspipette. Kolonnen stanses ut med ståltråd i en 200 µl pipettespiss og plasseres i et rent eppendorfrør.

2.8 Analyse ved LC-MS/MS

Instrumenter for analyse var Ultimate 3000 LC-system fra Dionex, LTQ XL ionefelle MS og LTQ Orbitrap Discovery fra Thermo Scientific. Det ble benyttet Acclaim PepMap® 75 µm x 15 cm nanoViper kolonne (Thermo Scientific).

Prøvene ble reløst i 100 µl loadingbuffer før analyse. Prøvene ble analysert ved omvendt-fase-kromatografi koblet med LC-MS/MS. Det ble benyttet en standard metode for analyse av peptider. Analysetiden var 90 minutter for hver prøve og injeksjonsvolumet var 20 µl. Selected-ion-monitoring (SIM) ble benyttet for analyse av signaturpeptidet. Massen som ble analysert var 635,35 m/z. Retensjonstiden for P-gp var ca. 30 minutter. Signaturpeptidet som ble valgt for P-gp var AGAVAEVLAIR [65].

Mobilfase A besto av 95% mQ-vann, 5% ACN og maursyre 0,1% av vannmengden, mens mobilfase B besto av 95% ACN, 5% mQ-vann og maursyre 0,1% av vannmengden. Det ble benyttet gradienteluering der 90% mobilfase A og 10% mobilfase B ble brukt innledningsvis. Etter 60 minutter ble mobilfase B justert opp til 60% mens mobilfase A ble justert ned til 40%. Fra 61-64 minutter ble det brukt 100% mobilfase B, før sammensetningen gikk tilbake til det opprinnelige (90% mobilfase A og 10% mobilfase B). Denne sammensetningen ble holdt konstant ut resten av analysetiden. Mobilfaseflow ble satt til 0,3 µl/min frem til 75 minutter. Flow ble justert opp til 0,4 µl/min fra 75-85 minutter, før den ble tilbakejustert til 0,3 µl/min under resten av analysen.

Til beregning av utbytte ble det benyttet topphøyde i stedet for toppenes areal, fordi topphøyden er mer robust enn integrering.

Analysevariasjon

Variasjon i analysemetoden ble undersøkt ved å analysere en prøve flere ganger. En prøve med 1 µl standardløsning og en prøve med 0,2 µl standardløsning ble analysert fem ganger. Det ble undersøkt om 0,2 µl ga topphøyder over laveste kvantifiseringsgrense (Lower limit of quantification, LLOQ) ved å undersøke signal-støy-forholdet (LLOQ signal/støy = 10).

Graden av "carry over" ble undersøkt ved å studere blanke prøver (kun loadingbuffer) analysert etter prøver med P-gp. To blanke prøver ble analysert etter prøver med 1 µl og 0,2 µl P-gp standard.

2.9 Optimalisering av metode

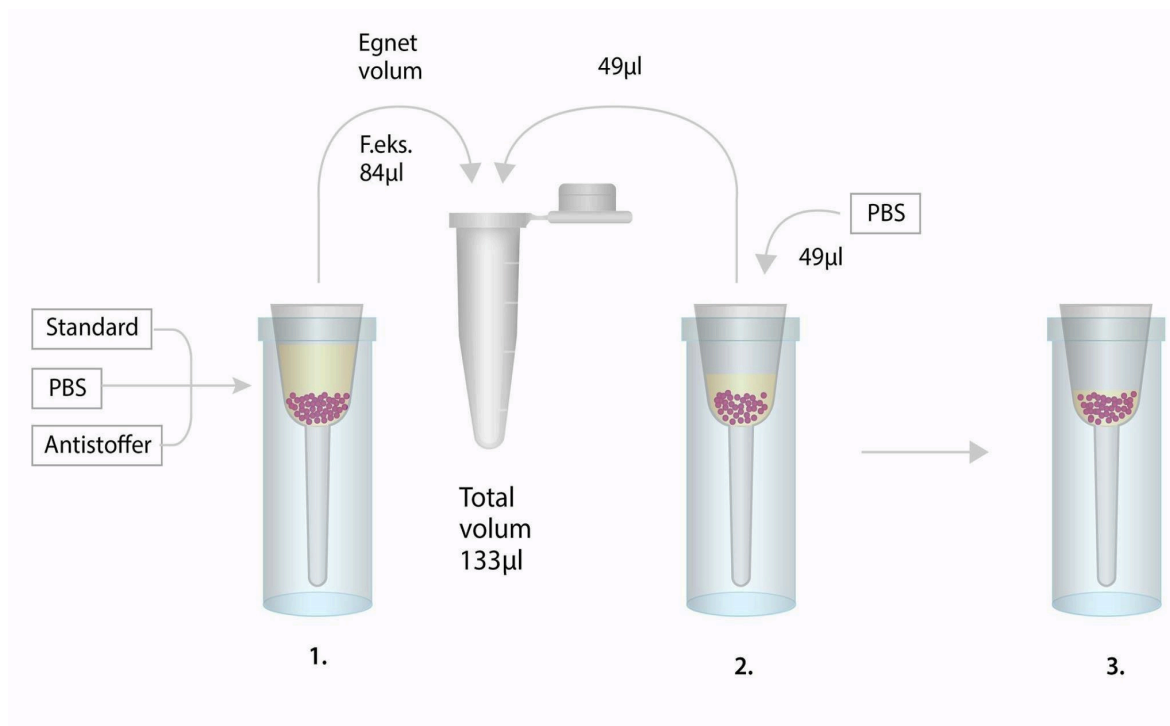
2.9.1 Homogenisering av PBMC og membranfragmenter

Til homogenisering av prøvemateriale ble det brukt bead-beating med Precellys®24 med forskjellige type rør og kuler. Effekt av ulike type rør, ulike typer kulemateriale og størrelse på kuler, hastigheter og tid for homogenisering ble testet.

Ulike størrelser på rør og ulike type kuler

Det ble gjort forsøk med 0,5 mm glasskuler i 0,5 ml rør, og 1,4 mm og 2,8 mm keramiske kuler i henholdsvis 0,5 ml og 2 ml rør. Precellysrør med 2,8 mm kuler ble laget ved å tilsette seks kuler i 2 ml tomme Precellysrør. De øvrige rørene som ble testet ble levert ferdig fylt med kuler fra leverandør. Prøvemateriale (0,2 µl P-gp standard), antistoffer og PBS ble tilsatt og homogenisert i 3x30 sekunder med hastighet på 5000 rpm. Etter homogenisering ble alt prøvemateriale pipettert ut fra Precellysrørene og tilsatt eppendorfrør. Det ble tilsatt 67 µl 600 µg/ml digitonin før det ble utført immunoekstraksjon, proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse av alle prøvene.

På grunn av ulik størrelse på Precellysrørene ble ulikt prøvevolum benyttet. Precellysrør som har et volum på 0,5 ml har et minstevolum på 5 µl og et maksimum volum på 200 µl, mens Precellysrør som har volum på 2 ml kan ha et prøvevolum fra minimum 200 µl til maksimum 1,6 ml [66]. Det ble benyttet et volum på 133 µl til 0,5 ml Precellysrør, mens det ble benyttet et volum på 200 µl til 2 ml Precellysrør. For å unngå at glasskulene fulgte med under overføring av prøvemateriale til nye eppendorfrør etter homogenisering ble prøvene raskt sentrifugert ved bruk av en bordsentrifuge. Et størst mulig volum uten glasskuler ble overført fra Precellysrørene til nye eppendorfrør. Deretter ble en gitt mengde PBS tilsatt Precellysrørene og blandet sammen med det resterende prøvevolumet. Prøvene ble så på nytt sentrifugert med bordsentrifuge før tilsvarende volum med PBS ble overført til eppendorfrørene. Ved bruk av denne metoden ble ikke alt overført fra Precellysrørene til eppendorfrørene, og noe av prøvemateriale ble liggende igjen blant glasskulene (figur 10).



Figur 10: 1. For å unngå at de små glasskulene fulgte med i pipettespissen under overføring av prøvemateriale ble først et størst mulig volum overført fra Precellysrørene til nye protein LoBin eppendorfrør. 2. Et volum på 49 µl PBS ble deretter tilsatt rørene og blandet, før tilsvarende volum ble overført til eppendorfrørene. 3. Ved denne metoden ble en del av prøvemateriale liggende igjen blant kulene.

Ulike betingelser for homogenisering

For å undersøke hvor kraftig behandling P-gp tåler i Precellys®24 ble det gjort forsøk der ulike hastigheter og tider for homogenisering ble testet. Det ble benyttet 0,5 ml Precellysrør med 0,5 mm glasskuler, og alle prøvene inneholdt 0,2 µl P-gp standard, 0,3 µg av hvert antistoff og PBS til et volum på 133 µl. Prøvemateriale og PBS ble tilsatt rørene og prøvene ble homogenisert ved ulike hastigheter og tider. Etter homogenisering ble det tilsatt 67 µl 600 µg/ml digitonin før immunoekstraksjon, proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse ble utført på alle prøvene. De ulike betingelsene som ble benyttet er presentert i tabell 2.

Tabell 2: Oversikt over ulike betingelser for homogenisering av prøver med P-gp standard i Precellys®24.

Hastighet (rpm)	Tid (sek)
5000	3x30
5000	4x20
5000	4x30
5500	3x15

2.9.2 Ekstraksjon med magnetiske kuler etter homogenisering

Det ble gjort forsøk der prøver bestående av PBMC blandet med P-gp standard ble ekstrahert med magnetiske kuler før prosedyre for immunoekstraksjon, proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse ble fulgt. Dette ble gjort for å undersøke om antistoffer fra cellene kunne fjernes fra prøven. Alle celler inneholder proteaser som frigis når cellene blir homogenisert. Proteaser er enzymer som spalter proteiner til mindre peptider. For å unngå at proteaser spaltet P-gp ble proteaseinhibitor tilsatt. Proteaseinhibitoren som ble brukt var Complete mini proteaseinhibitor cocktail (Complete mini, Roche). Denne ble laget ved å løse 1 tablett i 1,5 ml PBS.

Det ble laget totalt 9 prøver med PBMC, der tre paralleller ble tilsatt 20 µl proteaseinhibitor før homogenisering, tre paralleller ble tilsatt 20 µl proteaseinhibitor etter homogenisering, mens tre paralleller ikke ble tilsatt proteaseinhibitor. Alle celleprøvene ble tilsatt 0,2 µl P-gp standard. Det ble også laget seks prøver som kun inneholdt 0,2 µl P-gp standard, hvor tre paralleller ikke ble tilsatt proteaseinhibitor og tre paralleller ble tilsatt proteaseinhibitor før homogenisering. Deretter ble 0,3 µg av hvert antistoff tilsatt alle prøvene. Det ble så tilsatt PBS til et volum på 133 µl. Prøvene som ble tilsatt proteaseinhibitor etter homogenisering hadde et volum på 113 µl før homogenisering. Alle prøvene ble homogenisert i 3x30 sekunder ved 5000 rpm. Precellysrørene inneholdt 0,5 mm glasskuler og hadde et volum på 0,5 ml. Etter homogenisering ble prøvene raskt sentrifugert i bordsentrifuge. Tre paralleller ble tilsatt 20 µl proteaseinhibitor og blandet godt. Så mye som mulig av prøvematerialet ble overført til nye protein LoBin eppendorfrør uten å få med kuler. Det ble tatt ut 84 µl fra prøvene som kun inneholdt P-gp standard. Deretter ble 49 µl PBS tilsatt alle Precellysrørene og blandet godt, før tilsvarende volum ble overført til protein LoBin eppendorfrør. Magnetiske kuler dekket med Protein G (Dynabeads) ble resuspendert i 5 minutter på HulaMixer®. Det ble tatt ut 50 µl av kulesuspensjonen og tilsatt protein LoBin eppendorfrør. Kulene ble vasket 2 ganger med 200 µl PBS. Prøvene som inneholdt PBMC blandet med P-gp standard ble tilsatt de magnetiske kulene og inkubert på HulaMixer® i 15 minutter.

Etter inkubering ble supernatant overført til nye protein LoBin eppendorfrør og de magnetiske kulene ble kastet. Samtlige prøver ble så tilsatt 67 µl 600 µg/ml digitonin og videre ble prosedyre for immunoekstraksjon og proteolyse fulgt. Fast-fase ekstraksjon ble

utført før analyse med LC-MS/MS. Prøvene ble sammenlignet med prøver som kun inneholdt P-gp standard og som ikke tilsatt proteaseinhibitor før homogenisering.

2.9.3 Ulike konsentrasjoner proteaseinhibitor

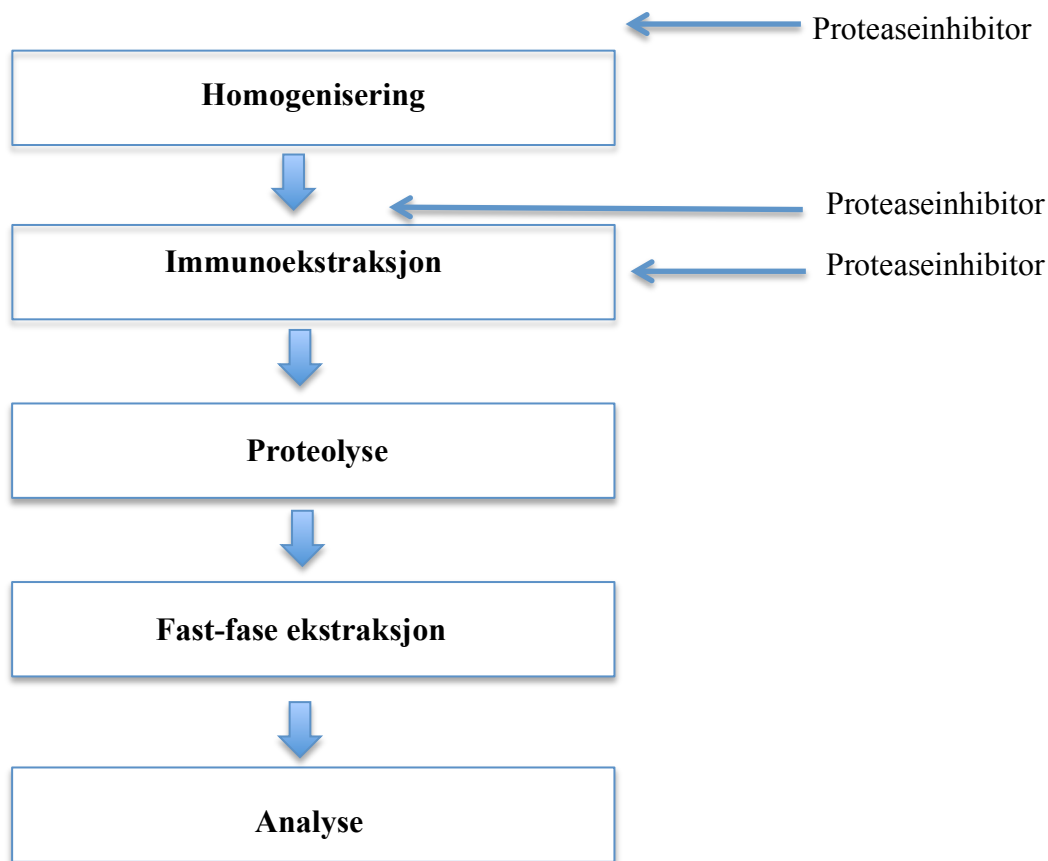
Innledende forsøk ga ingen detekterbare signaler for P-gp i prøver der proteaseinhibitor var tilsatt. Det ble derfor forsøkt å tilsette ulike konsentrasjoner med proteaseinhibitor til prøvene før homogenisering. Til disse forsøkene ble det kun benyttet P-gp standard som utgangsmateriale. Prøvene ble tilsatt 0,2 µl P-gp standard og 0,3 µg av hvert antistoff. Det ble tilsatt 5 µl, 10 µl og 20 µl proteaseinhibitor og PBS til et totalvolum på 133 µl før homogenisering. Alle prøvene ble homogenisert i 3x30 sekunder ved 5000 rpm. Det ble benyttet 0,5 ml Precellysrør med 0,5 mm glasskuler. Prøvene ble raskt sentrifugert på bordsentrifuge etter homogenisering før prøvene ble overført til nye eppendorfrør som beskrevet tidligere. Det ble tilsatt 67 µl 600 µg/ml digitonin til hver prøve før immunoekstraksjon, proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse ble utført.

2.9.4 Tilsetting av proteaseinhibitor uten EDTA

Complete mini proteaseinhibitor cocktail fra Roche finnes både med og uten EDTA. Det ble gjort forsøk der proteaseinhibitor uten EDTA ble tilsatt prøvene. Proteaseinhibitoren ble laget på samme måte som tidligere. Det ble tilsatt 0,2 µl P-gp standard, 20 µl proteaseinhibitor uten EDTA, 0,3 µg av hvert antistoff og 86,4 µl PBS i protein LoBineppendorfrør, og prøven ble blandet raskt på wirlmikser. Prøveløsningen ble så overført til 0,5 ml Precellysrør med 0,5 mm glasskuler. Prøvene ble homogenisert i 3x30 sekunder ved 5000 rpm. Deretter ble 67 µl 600 µg/ml digitonin tilsatt og blandet. Immunoekstraksjon, proteolyse og fast-fase ekstraksjon ble utført på alle prøvene før analyse. Prøvene ble sammenlignet med prøver som ikke ble tilsatt proteaseinhibitor før homogenisering.

2.9.5 Tilsats av proteaseinhibitor på ulike steder i prosedyren

Tidligere forsøk med proteaseinhibitor tilsatt før homogenisering ga ingen signaler for P-gp. For å undersøke mulig effekt av proteaseinhibitor på de ulike trinnene i prosedyren ble det utført forsøk der proteaseinhibitor ble tilsatt på ulike steder i prosedyren (figur 11). Det ble benyttet 0,5 ml Precellysrør med 0,5 mm glasskuler til alle forsøkene. Homogeniseringstiden var 3x30 sekunder med hastighet 5000 rpm. Det ble benyttet P-gp standard som utgangsmateriale for alle prøvene.



Figur 11: Skjematisk oversikt over prosedyre og tilsats av proteaseinhibitor på ulike tidspunkt i prosedyren. Proteaseinhibitor ble tilsatt før homogenisering, etter homogenisering og før immunoekstraksjon.

Tilsetning av proteaseinhibitor før homogenisering

Det ble gjort forsøk der proteaseinhibitor ble tilsatt prøvene før homogenisering. Til homogenisering ble det tilsatt 0,2 μ l P-gp standard, 0,3 μ g av begge antistoffene, 20 μ l proteaseinhibitor og PBS til et totalvolum på 133 μ l. Antistoffer ble tilsatt til prøvene før proteaseinhibitor. Prøvene ble blandet på wirlmikser og overført til Precellysrørene. Alle prøvene ble homogenisert i 3x30 sekunder ved 5000 rpm. Etter homogenisering ble alle prøvene sentrifugert raskt i bordsentrifuge før prøvene ble overført til nye eppendorfrør som beskrevet tidligere. Det ble tilsatt 67 μ l 600 μ g/ml digitonin og videre ble prosedyre for immunoekstraksjon, proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse fulgt som beskrevet tidligere. Som kontroller ble prøver som ikke ble tilsatt proteaseinhibitor før homogenisering og prøver som ble tilsatt proteaseinhibitor, men kun gjennomgikk immunoekstraksjon og proteolyse benyttet.

Tilsetting av proteaseinhibitor etter homogenisering

Det ble laget tre paralleller som inneholdt 0,2 µl P-gp standard og 0,3 µg av hvert antistoff og PBS. Prøvene ble blandet raskt på wirlmikser og så overført Precellysrør. Prøvene ble homogenisert i 3x30 sekunder ved 5000 rpm. Totalvolum før homogenisering var 113 µl. Etter homogenisering ble prøvene raskt sentrifugert med bordsentrifuge og overført til nye eppendorfrør. Alle prøvene ble tilsatt 20 µl proteaseinhibitor og blandet raskt på wirlmikser. Det ble tilsatt 67 µl 600 µg/ml digitonin til hver prøve før immunoekstraksjon, proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse ble utført.

Tilsetting av proteaseinhibitor før immunoekstraksjon

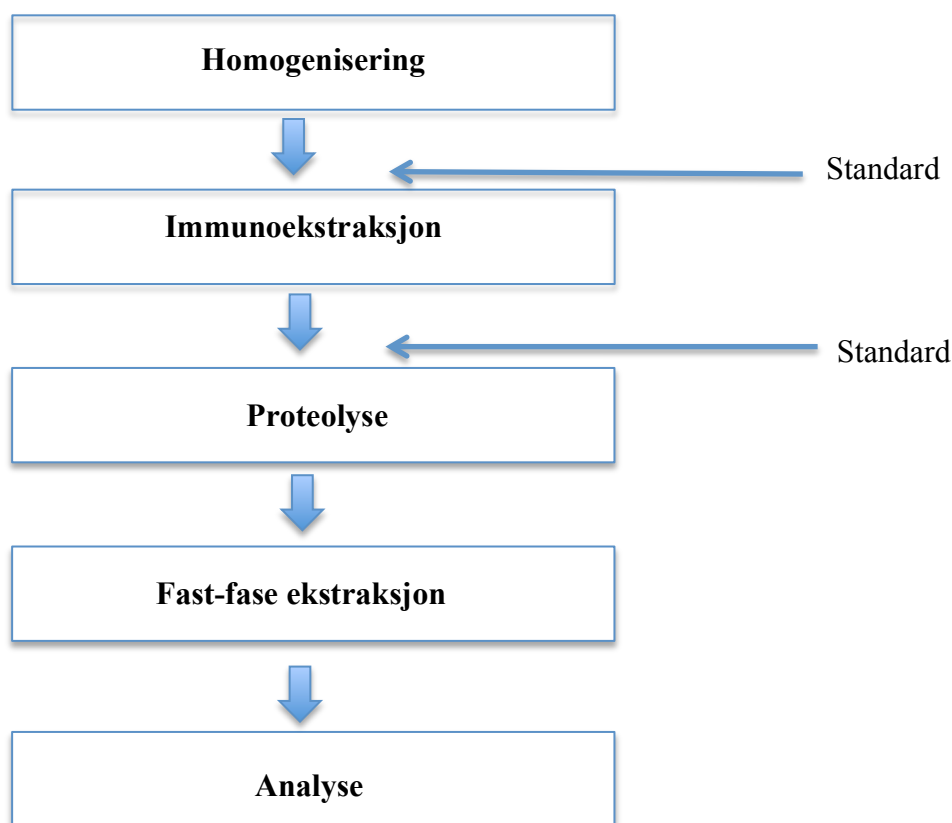
Det ble tilsatt 0,2 µl P-gp standard, 0,3 µg av begge antistoffene, 67 µl 600 µg/ml digitonin, 20 µl proteaseinhibitor og 86,4 µl PBS (totalvolum 200 µl) til protein LoBin eppendorfrør. Prøvene ble blandet på wirlmikser og indirekte immunoekstraksjon ble utført som beskrevet tidligere. Disse prøvene ble ikke homogenisert. Prøvene ble sammenlignet med prøver som gjennomgikk samme prosedyre, men hvor proteaseinhibitor ikke ble tilsatt. Proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse ble utført på alle prøvene.

2.9.6 Tilsats av antistoffer før og etter homogenisering

Det ble gjort forsøk der tilsats av antistoffer før og etter behandling med Precellys®24 ble undersøkt. Alle prøvene besto av 0,2 µl P-gp standard, 20 µl proteaseinhibitor og PBS, og disse ble blandet før homogenisering ble utført i 3x30 sekunder ved 5000 rpm. Det ble benyttet 0,5 ml Precellysrør fylt med 0,5 mm glasskuler. Tre prøver ble tilsatt 0,3 µg av hvert antistoff før homogenisering, mens tre prøver ble tilsatt antistoff etter homogenisering. Totalvolumet til prøvene med antistoffer var 133 µl før homogenisering, mens prøvene uten antistoffer hadde et totalvolum på 126,4 µl. Etter homogenisering ble prøvene sentrifugert i bordsentrifuge, og 84 µl av prøvene som ble tilsatt antistoff før homogenisering ble tatt ut til nye eppendorfrør. Det ble tatt ut 78 µl fra prøvene som ikke hadde antistoff før homogenisering. Det ble tilsatt 49 µl PBS til alle prøvene, og disse ble blandet før tilsvarende volum ble overført til eppendorfrørene. Prøvene som ikke hadde antistoffer før homogenisering ble tilsatt 0,3 µg av hvert antistoff. Deretter ble immunoekstraksjon, proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse utført som beskrevet på alle prøvene.

2.9.7 Tilsats av P-gp standard til ulike trinn

Det ble utført forsøk der P-gp standard ble tilsatt på ulike trinn i prosedyren (figur 12). Dette ble gjort for å undersøke om proteaseinhibitoren påvirket binding av antistoffer til P-gp og binding til de magnetiske kulene.



Figur 12: Skjematisk oversikt over tilsats av standard på ulike trinn i prosedyren. Standard ble tilsatt før immunoekstraksjon og før proteolyse.

For å undersøke om proteaseinhibitoren hindret binding til de magnetiske kulene ble det utført forsøk der antistoffer og proteaseinhibitor ble immunekstrahert før standard ble tilsatt. Prøvene besto av 20 µl proteaseinhibitor, 0,3 µg av hvert antistoff, 86,4 µl PBS og 67 µl 600 µg/ml digitonin som ble blandet sammen, og deretter ble prosedyre for immunoekstraksjon fulgt. Etter siste vask i prosedyren ble 0,2 µl P-gp standard tilsatt prøvene. Det ble så utført proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse av alle prøvene som beskrevet.

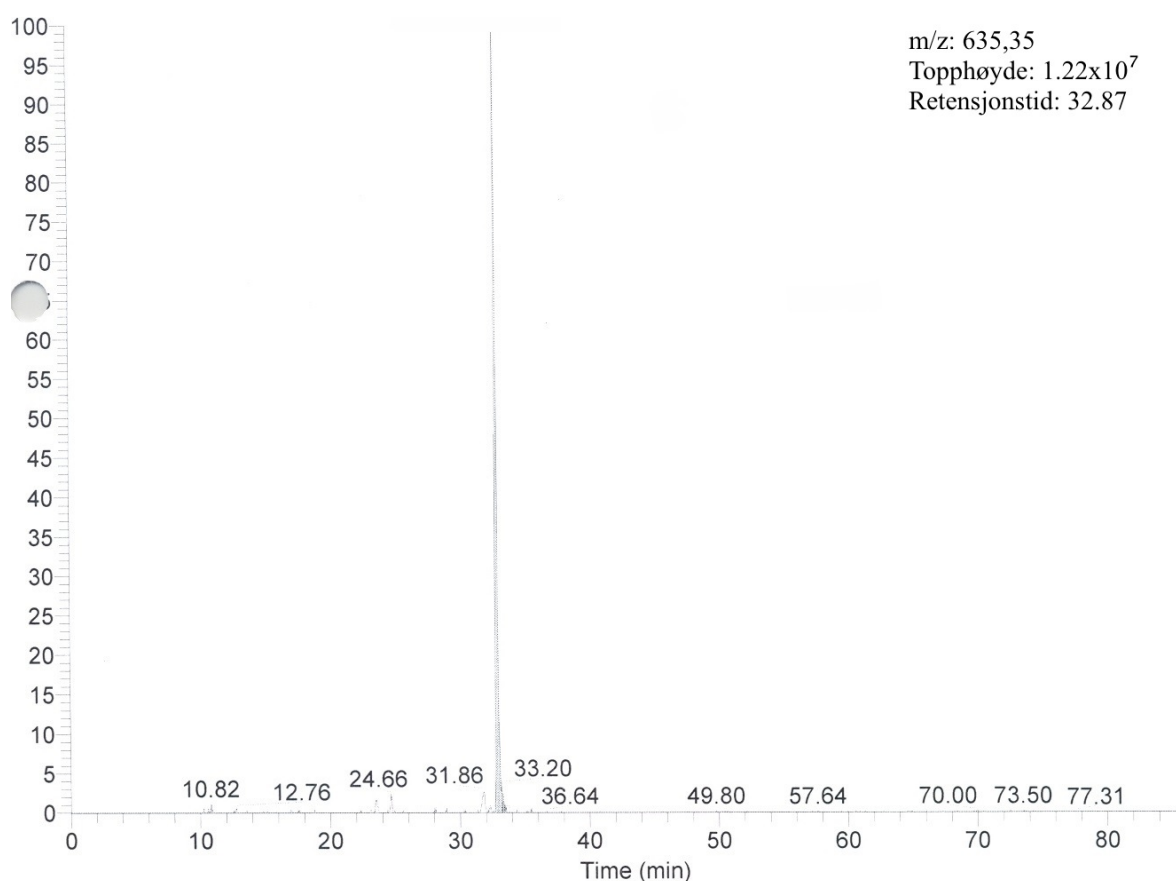
Det er en mulighet for at proteaseinhibitoren forhindrer binding av antistoff til standard. Et forsøk der antistoffer og proteaseinhibitor ble inkubert i 1 time på HulaMixer® før immunoekstraksjon ble utført. Det ble tilsatt 20 µl proteaseinhibitor, 0,3 µg av hvert antistoff og PBS til protein LoBin eppendorfrør som ble blandet på wirlmikser før inkubering. Det ble

tilsatt 0,2 µl P-gp standard og 67 µl 600 µg/ml digitonin før immunoekstraksjon. Prøvene hadde til immunoekstraksjon et totalvolum på 200 µl. Proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse ble deretter utført på alle prøvene.

3 Resultater

3.1 Analysevariasjon

Relativt standardavvik for repeterte målinger av samme prøve var 6,8% og 10,6% for henholdsvis 1 µl og 0,2 µl, noe som indikerer lav variasjon i analysen. Figur 9 viser et kromatogram for 0,2 µl P-gp standard. Forholdet mellom topphøyden og støyen er over 10 ganger signal/støy og er dermed innenfor kvantifiseringsgrensen.



Figur 9: Massekromatogram for signaturpeptidet for P-gp. Prøven inneholdt 0,2 µl standard.

”Carry over”

Det var ikke detekterbare mengder P-gp i blanke prøver analysert etter prøver med 0,2 µl og 1 µl P-gp standard, som vil si at det ikke var noe ”carry over” fra disse prøvene.

3.2 Repeterbarhet av uttak

Ved test av repeterbarhet viste uttakene på 0,2 µl prøvemateriale mindre variasjon enn uttak på 1 µl. Prøvene med 1 µl uttak hadde en gjennomsnittlig topphøyde på $6,12 \times 10^6$ med relativt standardavvik på 45%. Prøvene med 0,2 µl hadde gjennomsnittlig topphøyde på $1,29 \times 10^6$ med relativt standardavvik på 6,8%.

3.3 Ulik type kuler i Precellysrør

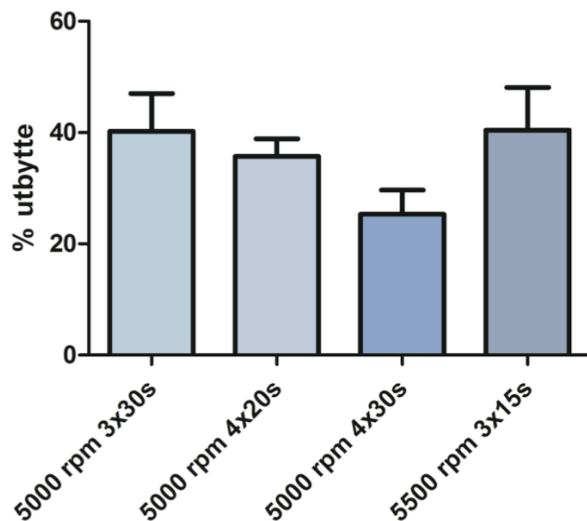
Ved test av ulike kuler i Precellysrørene ga 0,5 mm glasskuler signaler for P-gp med gjennomsnittlig topphøyde på $2,02 \times 10^6$ ($\pm 6\%$ rsd). Dette tilsvarte et utbytte på 50% i forhold til kontroll, som var prøver som gjennomgikk samme prosedyre uten forutgående homogenisering (tabell 3). Derimot ga forsøk med 1,4 mm keramiske kuler i 0,5 ml rør og 2,8 mm keramiske kuler i 2 ml rør ingen detekterbare mengder P-gp (tabell 3).

Tabell 3: Test av ulike kuler til homogenisering av P-gp standard (3x30 sekunder, 5000 rpm). Kontroll var P-gp standard som gjennomgikk samme prosedyre, uten forutgående homogenisering. Data er presentert som % utbytte i forhold til kontroll (gjennomsnitt \pm relativt SD).

2,8 mm keramiske kuler (n=3)	1,4 mm keramiske kuler (n=3)	0,5 mm glasskuler (n=2)
Ingen detekterbare resultater	Ingen detekterbare resultater	50% \pm 6% utbytte

3.4 Ulike betingelser for homogenisering

Forsøk med ulike betingelser for homogenisering viste at prøver som ble homogenisert i 4x30 sekunder ved 5000 rpm ga noe dårligere utbytte enn de øvrige betingelsene som ble testet (ca. 25% \pm 4% SD) (figur 13). Prøver som ble homogenisert i 3x30 sekunder ved 5000 rpm ga et godt utbytte og viste liten variasjon (ca. 40% utbytte \pm 7% SD)(figur 13). Disse betingelsene ble derfor brukt i videre forsøk.



Figur 13: Ulike betingelser for homogenisering. Utbytte ble beregnet fra kontrollprøver som hadde gjennomgått samme prosedyre, uten forutgående homogenisering. Data er presentert som % utbytte i forhold til kontroll (gjennomsnitt ± SD (n=3)).

3.5 Ekstraksjon med magnetiske kuler etter homogenisering

Forsøkene der celler blandet med standard ble ekstrahert med magnetiske kuler etter homogenisering ga ingen detekterbare mengder P-gp, verken for prøver som ble tilsatt proteaseinhibitor før eller for prøver tilsatt proteaseinhibitor etter homogenisering. Celler blandet med standard uten tilsatt proteaseinhibitor ga heller ingen signaler for P-gp.

3.6 Tilsetting av proteaseinhibitor

Ulike konsentrasjoner av proteaseinhibitor

Homogenisering av prøvene uten proteaseinhibitor tilstede ga detekterbare mengder P-gp. Signalene hadde en gjennomsnittlig topphøyde på $4,45 \times 10^6$ ($\pm 10\%$ rsd). Dette ga et utbytte på ca. 58% ($\pm 10\%$ rsd) av prøver som ikke ble homogenisert før immunoekstraksjon og som ikke ble tilsatt proteaseinhibitor. Tilsats av 20 μ l proteaseinhibitor før homogenisering ga derimot ingen detekterbare mengder P-gp. Ulike konsentrasjoner av proteaseinhibitoren ga ingen endringer i dette resultatet (tabell 4).

Tabell 4: Oversikt over resultater fra forsøk der proteaseinhibitor ble tilsatt i ulike konsentrasjoner. Kontroll er prøver som kun gjennomgikk immunoekstraksjon, uten proteaseinhibitor tilstede. Data er presentert som % utbytte i forhold til kontroll (gjennomsnitt \pm relativt SD (n=3)).

	Uten protease-inhibitor	5 μ l protease-inhibitor	10 μ l protease-inhibitor	20 μ l protease-inhibitor
Utbytte i forhold til kontroll (%)	58 \pm 10	Ingen detekterbare resultater	Ingen detekterbare resultater	Ingen detekterbare resultater

Proteaseinhibitor uten EDTA

Forsøk der proteaseinhibitor uten EDTA ble tilsatt ga ingen detekterbare mengder P-gp.

Proteaseinhibitor tilsatt på ulike tidspunkt i prosedyren

Forsøk der proteaseinhibitor ble tilsatt prøvene før homogenisering ga ingen detekterbare mengder P-gp. Det ble også gjort forsøk hvor proteaseinhibitor ble tilsatt etter at prøvene hadde blitt homogenisert. Dette ga ikke detekterbart utbytte av P-gp.

I forsøkene der proteaseinhibitor ble tilsatt før immunoekstraksjon uten forutgående homogenisering ble det målt signaler for P-gp. Forsøkene viste at utbyttet av prøver med proteaseinhibitor var ca. 35% (\pm 26% rsd) mot ca. 34% (\pm 24% rsd) for prøver uten proteaseinhibitor (n=3). Det vil si at tilsetning av proteaseinhibitoren til dette trinnet i prosedyren ikke forstyrret immunoekstraksjonen og ga ikke dårligere utbytte.

3.7 Antistoffer tilsatt før og etter homogenisering

Forsøk der antistoffer ble tilsatt før og etter homogenisering med Precellys®24 ga ingen detekterbare mengder P-gp.

3.8 Standard tilsatt før og etter immunoekstraksjon

Standard tilsatt før immunoekstraksjon ga et utbytte på 42% (\pm 3% rsd) i forhold til prøver som kun gjennomgikk proteolyse (gjennomsnittlig topphøyde $2,0 \times 10^6$ (\pm 3% rsd) mot $4,7 \times 10^6$ (\pm 10% rsd)). Ved tilsetning av standard etter immunoekstraksjon av proteaseinhibitor og antistoffer ble utbytte ca. 86% (\pm 9% rsd) i forhold til prøver som kun gjennomgikk proteolyse (gjennomsnittlig topphøyde $7,7 \times 10^6$ (\pm 9% rsd) mot $9,1 \times 10^6$ (\pm 10% rsd)). Dette vil si at ca. 86% utbytte er det teoretisk høyeste utbyttet som oppnås ved immunoekstraksjon.

3.9 Beregning av utbytte

Underveis i prosedyren går en del av prøvemateriale tapt. Utbytte av P-gp i prøver som gjennomgikk immunoekstraksjon og proteolyse var gjennomsnittlig 46% ($\pm 26\%$ rsd, $n=7$) av prøver som kun gjennomgikk proteolyse. Prøver som gjennomgikk hele prosedyren hadde et gjennomsnittlig utbytte på ca. 51% ($\pm 30\%$ rsd, $n=6$) av prøver som kun gjennomgikk immunoekstraksjon og proteolyse. Det vil si at ved hvert trinn i prosedyren går omtrent halvparten av prøvematerialet tapt.

4 Diskusjon

Prøveopparbeidelse bestående av homogenisering, immunoekstraksjon, proteolyse, fast-fase ekstraksjon og analyse med LC-MS/MS gjør det mulig å detektere P-gp i membraner fra transfekterte insektsceller. Et forsøk på å optimalisere metoden slik at den kan benyttes for å måle P-gp i PBMC har ikke vært vellykket.

Det er per i dag ingen publikasjoner på kvantifisering av P-gp i lymfocytter. Andre forskningsgrupper har i midlertidig målt P-gp i andre type vev og transfekterte celledsystemer [28, 49]. Yang et al. kvantifiserte P-gp en legemiddelsensitiv og en legemiddelresistent brystkreftcellelinje [51]. Samme forskningsgruppe har senere målt P-gp i brystvev fra pasienter med invasiv brystkreft [48]. Forsøk på å måle P-gp i lymfocytter isolert fra fullblod fra friske frivillige har midlertidig ikke vært vellykket. Siden P-gp detekteres i standard, men lar seg ikke detektere i prøver der celler ble blandet med standard, kan en mulig årsak være at det er komponenter i cellene som forstyrrer analysen. PBMC isolert fra fullblod inneholder lymfocytter og monocytter. Lymfocytter utgjøres av tre hovedtyper; B-celler, T-celler og naturlige drepeceller (natural killer cells), og av disse er B-celler antistoffproduserende celler. Det er mulig at endogene antistoffer som frigis fra cellene under homogeniseringen hinder binding av P-gp-antistoffkomplekset til de magnetiske kulene ved at bindingssetene på kulene blir opptatt av endogene antistoffer. Det ble derfor gjort forsøk der prøvene ble tilsatt et overskudd med magnetiske kuler etter homogenisering. I teorien vil de frigjorte endogene antistoffene binde seg til magnetiske kulene. Etter inkubering ble de magnetiske kulene kastet slik at endogene antistoffer ble fjernet fra prøven. Nye kuler ble tilsatt til immunoekstraksjon, og P-gp-antistoffkomplekset vil kunne binde seg uhindret til disse kulene. Dette forsøket ga derimot ingen detekterbare mengder P-gp. Det er derfor tvilsomt at dette er eneste årsak til at P-gp ikke lar seg detektere i lymfocytter.

Cellene inneholder i tillegg proteaser som frigis når cellen sprekker eller blir ødelagt. Proteaser er enzymer som spalter proteiner til mindre peptider. Disse proteasene kan potensielt spalte P-gp på uspesifikke steder slik at signaturpeptidet ikke dannes og dermed kan ikke analyse utføres. For å hindre dette ble det forsøkt å tilsette proteaseinhibitor til prøvene. Proteaseinhibitoren som ble benyttet, Complete mini proteaseinhibitor cocktail (Complete mini), er en blanding av forskjellige typer inhibitorer, og inhiberer serin-, cystein- og metallproteaser. Denne proteaseinhibitoren er anbefalt av produsenten for inhibering av proteolytisk aktivitet i prøver med volum <50 ml. Proteaseinhibitoren skal kunne hemme

proteolytisk aktivitet i en rekke ulike typer celler og vev, blant annet i humane perifere blodceller [67, 68]. Andre forskningsgrupper som har kvantifisert P-gp i biologiske matrikser har tilsatt proteaseinhibitor til prøvene underveis i prosedyren, og Miliotis et al. benyttet seg også av Complete mini [28, 48, 49, 51]. Innledningsvis ble det derfor utført forsøk der proteaseinhibitor ble tilsatt P-gp standard før homogenisering, men dette ga imidlertid ingen detekterbare mengder P-gp. I produktbeskrivelsen til Complete mini kommer det ikke klart frem hvor mye proteaseinhibitor som skal tilsettes. I tilgjengelig litteratur nevnes det heller ikke hvor mye proteaseinhibitor som ble tilsatt under prøveopparbeidelsen [28, 48, 49, 51]. Det kunne tenkes at for mye proteaseinhibitor kunne forstyrre prøvene, og det ble derfor testet ulike konsentrasjoner av proteaseinhibitor i prøvene før homogenisering. Ingen av de anvendte konsentrasjonene ga detekterbare mengder P-gp. Complete mini inneholder, i tillegg til flere ulike type inhibitorer, også EDTA. EDTA er et chelaterende agens som danner komplekser med metallioner og brukes for å fjerne metallioner fra prøven. Complete mini finnes både med og uten EDTA, og det ble derfor undersøkt om EDTA i proteaseinhibitorcocktailen kunne påvirke et av trinnene underveis i prosedyren. Da tilsetning av proteaseinhibitor uten EDTA før homogenisering ikke ga detekterbare signaler for P-gp regnes det som lite sannsynlig at EDTA er eneste årsak til at P-gp ikke detekteres.

Tilsetning av proteaseinhibitor før homogenisering viste seg å forstyrre prosedyren. Det var derimot usikkert om det var under homogenisering, under immunoekstraksjon eller under proteolyse proteaseinhibitoren forstyrret prosedyren. Manglende resultat kan skyldes at proteaseinhibitoren hindret binding av antistoff til P-gp, eller binding av P-gp-komplekset til de magnetiske kulene. En annen teori er at proteaseinhibitoren ikke ble tilstrekkelig vasket bort før proteolyse, og dermed hindret virkningen av trypsin. Resultatene fra forsøk der proteaseinhibitor ble tilsatt prøver som gjennomgikk immunoekstraksjon uten forutgående homogenisering viste imidlertid signaler for P-gp, med tilsvarende utbytte for prøver tilsatt proteaseinhibitor sammenlignet med prøver uten. Det betyr at proteaseinhibitor verken forstyrrer noen av trinnene under immunoekstraksjonen eller hemmer effekten av trypsin. Siden forsøk der proteaseinhibitor tilsatt før homogenisering ikke ga detekterbare mengder P-gp ble det gjort forsøk der proteaseinhibitor ble tilsatt etter homogenisering for å undersøke om proteaseinhibitoren forstyrret et element under behandling med Precellys®24. Da dette heller ikke ga signaler for P-gp kunne det tenkes at P-gp ikke tålte behandlingen i Precellys®24. Prøver som ble homogenisert uten tilsetning av proteaseinhibitor ga derimot detekterbare mengder P-gp, noe som avkrefter denne teorien.

Etter å ha undersøkt mange ulike trinn i forbindelse med tilsats av proteaseinhibitor er det fortsatt uklart hvorfor det ikke blir resultater fra prøver der proteaseinhibitor ble tilsatt før og etter homogenisering. Dette er en avgjørende faktor i metodeutviklingen, ettersom proteaser fra cellene trolig vil proteolysere P-gp uspesifikt med den følge at analyse av signaturpeptidet blir vanskelig.

En del av metodeutviklingen besto av å identifisere de mest optimale betingelsene for homogenisering slik at prøvemateriale ble tilstrekkelig ødelagt og minst mulig gikk tapt underveis i prosedyren. Ved bruk av 0,5 mm glasskuler ble de små kulene fordelt i hele prøven under homogeniseringen. Ved uttak av prøvemateriale har de små kulene gjort det vanskelig å få med alt prøvemateriale fra Precellysrørene (figur 10). Ved bruk av større kuler vil ikke kulene følge med i pipettespissene og overføring av prøvemateriale vil være lettere. Dette er et viktig punkt med tanke på at prøvevolumet i utgangspunktet er lite og et tap av prøvemateriale kan gi utslag på kvantifiseringsgrensen. Samtidig er det viktig å unngå for tøff behandling med hardt kulemateriale siden det kan øke risikoen for at materiale blir ødelagt slik at analyse av P-gp ikke er mulig. Forsøket med ulike kuler viste imidlertid at kun 0,5 mm glasskuler ga detekterbare mengder P-gp og disse kulene ble benyttet i senere forsøk. Lang nok homogeniseringstid og passende hastighet er viktig for at cellene skal bli tilstrekkelig homogenisert. Tidligere forsøk har indikert at lengere homogeniseringstid har gitt større utbytte P-gp [65]. Resultat fra forsøk med ulike betingelser viste at 4x30 sekunder ved 5000 rpm ga noe lavere utbytte enn de øvrige betingelsene. Homogenisering i 3x30 sekunder ga et godt utbytte og hadde lite variasjon. Disse betingelsene ble derfor benyttet i senere forsøk.

Til tross for relativt godt utbytte ved bruk av Precellys®24 kan det spekuleres i om det er nødvendig å benytte en annen metode for homogenisering da forsøk med P-gp standard med proteaseinhibitor homogenisert med bead-beating ikke har vært vellykket. Yang et al. har benyttet Bio-Gen PRO200 homogenisator, mens Miliotis et al. benyttet seg av Dounce homogenisator [28, 48]. Lite prøvevolum gjør midlertidig homogenisering med Dounce vanskelig og lite egnet for lymfocytter. Det kan også vurderes om homogenisering med vortexmiksing kan være et alternativ. PBMC er et relativt mykt materiale. Cellene sprekker i hypotont miljø, og det kan tenkes at vortexmiksing i hypotone betingelser kan gi tilstrekkelig ødeleggelse av cellene [58].

En annen mulig årsak til at P-gp ikke lar seg detektere i celleprøvene kan være det lave nivået av P-gp i lymfocytter hos friske personer. Det er ingen forskningsgrupper som per i dag har absolutt kvantifisert transportøren i lymfocytter, men Vilas-Boas et al. studerte ekspresjon av P-gp i lymfocytter ved hjelp av flow-cytometri i friske menn, og fant at ca. 40% av cellene uttrykte P-gp [69]. Det er vist at P-gp er oppregulert i celler fra pasienter med kreft og inflammatorisk sykdom som for eksempel systemisk lupus erythematosus, sammenlignet med normale celler [41]. Det kan derfor tenkes at en analyse kunne vært vellykket dersom det ble benyttet celler fra pasienter med kjent sykdom, som Yang et al. gjorde i sin studie [48]. For videre metodeutvikling kan det forsøkes å benytte metoden med celler der det er større sannsynlighet for at mengden P-gp er økt.

I løpet av prosedyren går en del av prøvematerialet tapt, og i hvert trinn reduseres utbyttet med ca. 50%. Noe av prøvematerialet blir liggende igjen blant glasskulene i Precellysrørene og en del går tapt ved overføring mellom eppendorfrør og vask under immunoekstraksjon. Andre typer prøveopparbeidelser kan minske tap av prøvolum. Flere av forskningsgruppene som har målt P-gp i biologiske matrikser har benyttet seg av ekstraksjonsbuffer for isolering av membranproteiner. Ved bruk av ekstraksjonsbuffer ekstraheres membranproteinene fra membranen, gjerne ved hjelp av surfaktanter. Triton X-114 ble benyttet i to av studiene. Triton X-114 er en ikke-ionisk detergent som løser opp membranproteiner og separerer dem fra andre hydrofile proteiner ved fase-separasjon [48, 51]. Ulempen ved en slik prøveopparbeidelse er at det ikke gir mulighet for oppkonsentrering og opprensing av analytten. Miliotis et al. og Yang et al. løste dette ved å separere P-gp fra andre proteiner ved gelseparasjon [28, 51]. Prøven plasseres på en gel der proteinene blir separert etter størrelse, og proteinet som korresponderer med P-gps størrelse kan så isoleres fra resten av prøven. Sentrifugering av prøven kan også benyttes. Etter ekstrahering med buffer sentrifugeres prøven slik at det dannes en cellepellet og supernatant med cytosoliske proteiner som kan interferere med analysen fjernes. Zhang et al. benyttet seg av dette i sin prosedyre [49]. En prøveopparbeidelse med gelseparasjon og sentrifugering er imidlertid ikke like spesifikk som bruk av antistoffer. En utilstrekkelig opprensing av prøven vil føre til at andre peptider og forurensinger vil forstyrre analysen, og det setter krav til en mer sensitiv analyse.

De viktigste parameterne ved en MS-detektor er grad av oppløsning, sensitivitet, massenøyaktighet og muligheten til å kunne gi informative massespektre [70]. Ved å bytte

MS-detektor til trippelkvadropol eller trippelkvadropol koblet til nano-LC kan en mer sensitiv analyse og en lavere deteksjonsgrense for signaturpeptidet antagelig oppnås. Dette øker muligheten for at P-gp kan detekteres, til tross for et lavt uttrykk av P-gp i PBMC.

En vellykket kvantifisering av P-gp vil kunne være et nyttig verktøy i forståelsen av individuell variabilitet i legemiddelbehandling. En slik metode vil også kunne benyttes til å måle P-gp i andre vev enn lymfocytter, som for eksempel nyrer og lever. Spesielt interessant vil det være å sammenligne P-gp-ekspresjon med P-gp aktivitet. I lymfocytter kan P-gp-aktivitet måles med blant annet Rhodamin 123-effluksmetoden, en metode som allerede er etablert i vår forskningsgruppe. Flow-cytometri kan benyttes på forhånd til å selektere bort døde celler slik at aktiviteten kan måles kun hos aktiverte lymfocytter, noe som vil bedre metodens nøyaktighet [71]. Ved å sammenligne P-gp aktivitet med mengden av P-gp i lymfocytter kan det undersøkes om det er en sammenheng mellom aktivitet og mengde P-gp hos pasienter med og uten rejeksjon. Sammen med intracellulære målinger av immundependende legemidler kan dette være et skritt på veien i forståelsen av intra- og interindividuell forskjell i respons på legemidlene. Det kan også være nyttige verktøy til å optimalisere en individuell dosering av legemidler til disse pasientene, noe som igjen kan føre til bedre effekt og færre bivirkninger.

5 Konklusjon

Det er vist at denne metoden kan benyttes til å måle P-gp i transfekterte cellemembraner. Forsøk på å optimalisere metoden slik at den kan benyttes for å måle P-gp i lymfocytter har vist seg å ikke være vellykket. Tilsats av proteaseinhibitor før og etter homogenisering ga ikke detekterbare mengder P-gp og årsaken til dette er trolig relatert til homogeniseringsmetoden. For at metoden skal kunne benyttes for kvantifisering av transportøren i lymfocytter isolert fra fullblod er videre optimalisering nødvendig.

Litteraturliste

1. Wilkinson, G.R., *Drug metabolism and variability among patients in drug response*. N Engl J Med, 2005. **352**(21): p. 2211-21.
2. Thummel, K.E. and Y.S. Lin, *Sources of interindividual variability*. Methods Mol Biol, 2014. **1113**: p. 363-415.
3. Evans, W.E. and H.L. McLeod, *Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(6): p. 538-549.
4. Rowland, M. and T.N. Tozer, *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics - concepts and applications*. Fourth ed. 2011, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
5. Pozgain, I., Z. Pozgain, and D. Degmecic, *Placebo and nocebo effect: a mini-review*. Psychiatr Danub, 2014. **26**(2): p. 100-7.
6. Blumenthal, D.K. and J.C. Garrison, *Chapter 3. Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action*, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e*, L.L. Brunton, B.A. Chabner, and B.C. Knollmann, Editors. 2011, The McGraw-Hill Companies: New York, NY.
7. Lin, J.H., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic variability: a daunting challenge in drug therapy*. Curr Drug Metab, 2007. **8**(2): p. 109-36.
8. Buxton, I.L.O. and L.Z. Benet, *Chapter 2. Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination*, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e*, L.L. Brunton, B.A. Chabner, and B.C. Knollmann, Editors. 2011, The McGraw-Hill Companies: New York, NY.
9. Werk, A.N. and I. Cascorbi, *Functional gene variants of CYP3A4*. Clin Pharmacol Ther, 2014. **96**(3): p. 340-8.
10. Verbeeck, R.K. and F.T. Musuamba, *Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. **65**(8): p. 757-73.
11. Verbeeck, R.K., *Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction*. Eur J Clin Pharmacol, 2008. **64**(12): p. 1147-61.
12. Scherrmann, J.M., *Transporters in absorption, distribution, and elimination*. Chem Biodivers, 2009. **6**(11): p. 1933-42.
13. Lai, Y., et al., *Impact of drug transporter pharmacogenomics on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability - considerations for drug development*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(6): p. 723-43.
14. DeGorter, M.K., et al., *Drug transporters in drug efficacy and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012. **52**: p. 249-73.
15. Hediger, M.A., et al., *The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 95-107.
16. Keogh, J.P., *Membrane transporters in drug development*. Adv Pharmacol, 2012. **63**: p. 1-42.
17. Moss, D.M., M. Neary, and A. Owen, *The role of drug transporters in the kidney: lessons from tenofovir*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 248.
18. Giacomini, K.M. and Y. Sugiyama, *Chapter 5. Membrane Transporters and Drug Response*. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12 ed., New York: McGraw- Hill Medical.
19. ter Beek, J., A. Guskov, and D.J. Slotboom, *Structural diversity of ABC transporters*. J Gen Physiol, 2014. **143**(4): p. 419-35.

20. Biemans-Oldehinkel, E., M.K. Doeven, and B. Poolman, *ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1023-35.
21. Zhou, S.-F., *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 802-832.
22. Garcia-Carrasco, M., et al., *P-glycoprotein in autoimmune rheumatic diseases*. Autoimmun Rev, 2015.
23. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein multidrug transporter*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 161-78.
24. Prajapati, R. and A.T. Sangamwar, *Translocation mechanism of P-glycoprotein and conformational changes occurring at drug-binding site: Insights from multi-targeted molecular dynamics*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2014. **1838**(11): p. 2882-2898.
25. Sauna, Z.E., I.W. Kim, and S.V. Ambudkar, *Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1)*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(5-6): p. 481-7.
26. Ambudkar, S.V., I.-W. Kim, and Z.E. Sauna, *The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1)*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **27**(5): p. 392-400.
27. Silva, R., et al., *Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy*. Pharmacol Ther, 2015. **149**(0): p. 1-123.
28. Miliotis, T., et al., *Development of a highly sensitive method using liquid chromatography-multiple reaction monitoring to quantify membrane P-glycoprotein in biological matrices and relationship to transport function*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(12): p. 2440-9.
29. Kock, K., et al., *Expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) drug transporters in peripheral blood cells: relevance for physiology and pharmacotherapy*. Clin Pharmacokinet, 2007. **46**(6): p. 449-70.
30. Callaghan, R., R.C. Ford, and I.D. Kerr, *The translocation mechanism of P-glycoprotein*. FEBS Letters, 2006. **580**(4): p. 1056-1063.
31. O'Brien, F.E., et al., *Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood-brain barrier: clinical significance of in vitro and in vivo findings*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(2): p. 289-312.
32. Giacomini, K.M., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
33. Kim, R.B., *Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers*. Drug Metabolism Reviews, 2002. **34**(1-2): p. 47-54.
34. Hoffmeyer, S., et al., *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3473-8.
35. Vafadari, R., et al., *Genetic polymorphisms in ABCB1 influence the pharmacodynamics of tacrolimus*. Ther Drug Monit, 2013. **35**(4): p. 459-65.
36. Verstuyft, C., et al., *Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms*. Eur J Clin Pharmacol, 2003. **58**(12): p. 809-12.
37. Gerloff, T., et al., *MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males*. Br J Clin Pharmacol, 2002. **54**(6): p. 610-6.
38. Sakaeda, T., et al., *MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects*. Pharm Res, 2001. **18**(10): p. 1400-4.
39. Chowbay, B., et al., *Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression*. Br J Clin Pharmacol, 2005. **60**(2): p. 159-71.

40. Schinkel, A.H., et al., *Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1698-705.
41. Tsujimura, S. and Y. Tanaka, *Treatment strategy based on targeting P-glycoprotein on peripheral lymphocytes in patients with systemic autoimmune disease*. Clin Exp Nephrol, 2012. **16**(1): p. 102-8.
42. Tsujimura, S., et al., *Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes*. Genes Cells, 2004. **9**(12): p. 1265-73.
43. Holohan, C., et al., *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(10): p. 714-726.
44. Henmi, K., et al., *P-glycoprotein functions in peripheral-blood CD4+ cells of patients with systemic lupus erythematosus*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(5): p. 873-8.
45. Yudoh, K., et al., *Increased expression of multidrug resistance of P-glycoprotein on Th1 cells correlates with drug resistance in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(9): p. 2014-5.
46. Gotzl, M., et al., *MDR1 gene expression in lymphocytes of patients with renal transplants*. Nephron, 1995. **69**(3): p. 277-80.
47. Falck, P., et al., *Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients*. Transplantation, 2008. **85**(2): p. 179-84.
48. Yang, T., et al., *A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based targeted proteomics assay for monitoring P-glycoprotein levels in human breast tissue*. Clin Chim Acta, 2014. **436**: p. 283-9.
49. Zhang, Y., et al., *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry based targeted proteomics quantification of P-glycoprotein in various biological samples*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011. **25**(12): p. 1715-24.
50. Prasad, B. and J.D. Unadkat, *Optimized approaches for quantification of drug transporters in tissues and cells by MRM proteomics*. Aaps j, 2014. **16**(4): p. 634-48.
51. Yang, T., et al., *Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based targeted proteomics and conventional analytical methods for the determination of P-glycoprotein in human breast cancer cells*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013. **936**: p. 18-24.
52. Dittrich, J., et al., *Sample preparation strategies for targeted proteomics via proteotypic peptides in human blood using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Proteomics Clin Appl, 2015. **9**(1-2): p. 5-16.
53. Matthiesen, R. and K. Mutenda, *Introduction to Proteomics*, in *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*, R. Matthiesen, Editor. 2007, Humana Press. p. 1-35.
54. Scherl, A., *Clinical protein mass spectrometry*. Methods, (0).
55. Helbig, A.O., A.J. Heck, and M. Slijper, *Exploring the membrane proteome--challenges and analytical strategies*. J Proteomics, 2010. **73**(5): p. 868-78.
56. Vuckovic, D., et al., *Membrane proteomics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Analytical approaches and challenges*. Proteomics, 2013. **13**(3-4): p. 404-23.
57. *Digitonin used as a non- ionic detergent*[cited 2015- 01.04]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d141?lang=en®ion=NO>.
58. Smith, K.M. and Y. Xu, *Tissue sample preparation in bioanalytical assays*. Bioanalysis, 2012. **4**(6): p. 741-9.
59. *Precellys* [cited 2015- 08.03]; Available from: <http://www.precellys.com/precellys-24.aspx>.

60. Shen, J.X., G. Liu, and Y. Zhao, *Strategies for improving sensitivity and selectivity for the quantitation of biotherapeutics in biological matrix using LC-MS/MS*. Expert Rev Proteomics, 2015: p. 1-7.
61. Pedersen- Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. Vol. 2. 2010: Fagbokforlaget.
62. Pottiez, G., *Mass Spectrometry: Developmental Approaches to Answer Biological Questions*. SpringerBriefs in Bioengineering. 2015: Springer.
63. Makarov, A. and M. Scigelova, *Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(25): p. 3938-45.
64. Ahlsen, K., *Aktivitet av P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod*. 2014, Universitet i Oslo: Oslo.
65. Jensen, B.A., *Utvikling av en kvantitativ proteomikkmetode for P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod*. 2012, Universitet i Oslo.
66. *Precellys lysing kit*. [cited 2015- 08.03]; Available from: <http://www.precellys.com/lysing-kits.aspx>.
67. Roche Applied Science. *The Complete Guide for Protease Inhibition*. [cited 2015- 06.05]; Available from: <http://iti.stanford.edu/content/dam/sm/iti/documents/himc/immunoassays/ProteaseInhibitionGuide.pdf>.
68. Roche. *cOmplete, mini*. [cited 2015- 06.05]; Available from: <http://lifescience.roche.com/shop/en/no/products/complete-mini>.
69. Vilas-Boas, V., et al., *P-glycoprotein activity in human Caucasian male lymphocytes does not follow its increased expression during aging*. Cytometry A, 2011. **79**(11): p. 912-9.
70. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
71. Petriz, J. and J. Garcia-Lopez, *Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123*. Leukemia, 1997. **11**(7): p. 1124-30.